



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

***MATRICES BIODEGRADABLES COMO SOPORTES DE MICRO
Y NANOPARTÍCULAS ACTIVAS PARA SU APLICACIÓN COMO
SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA***

Tesista: Lic. Javier Lamarra

Directora: Dra. Adriana Pinotti

Codirectora: Dra. Sandra Rivero

Año: 2019

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que han formado parte de esta etapa tan importante para mi vida personal y profesional.

A mis directoras de Tesis Adriana Pinotti y Sandra Rivero quienes me han guiado en este arduo pero gratificante camino por la confianza depositada en mí, su permanente apoyo, paciencia, generosidad y permanentes consejos.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por permitirme realizar este trabajo de tesis en el CIDCA.

A mis amigos que me ha dado este camino, con quienes he compartido gratos momentos dentro y fuera del instituto: Alejo, John, Juan, Juani, Juli, Flor y Pau.

A mis compañeros de Box, con los cuales hemos compartido amplias horas de trabajo: Viviana, Sandro, Dolo y Emanuel.

A mis compañeros de Viernes Dulce: Alejandra, Jessica, Pablo, Nora, Flor V., Eli, Yuli, Andre, Aline, Flor O., Alejandro, Belén, Cintia, Natalia y Marina.

A Javier Lecot y Daniel Ruso por su buena predisposición y por haberme otorgado turnos para el DSC.

A Leda Gianuzzi por la ayuda en los ensayos de microbiología.

A todas las personas que participaron desinteresadamente del ensayo de difusión en pieles: Mari, Mati, Yuli y Flor.

A Jorge Montanari, Ramiro Llovera, y Natalia Callieni por su ayuda en los ensayos de difusión en pieles.

A Jorge Wagner por permitirme utilizar el equipo de tamaño de partícula de la UNQ.

A mis compañero del Futbol del cidca, por compartir momentos deportivos todos los miércoles.

A todos mis compañeros de la cátedra de Fisicoquímica.

A todo el personal del CIDCA por hacerme sentir parte del instituto.

A los amigos que conocí en la facultad y me han acompañado en todo este camino: Cele, Lau, Eze, Nati, Grillo, Gise, Cintia, Nere, nEmi y Javo.

A mis colegas y amigos de la carrera de química: Agus, Bruno, Fiore, Hernan, Juanjo, Javi y Yani.

A mis amigos de la vida, que me han acompañado siempre: Leo, Bata, David, Topo, Gusti, Jesi, Lucho, Lu, Loa, Ima y Nico.

A mis compañeros productores de cerveza: Damian y Juani.

A mis amigos de la peña de los jueves: Ema, Javi, Juanjo y Ale.

A mi Familia: Tío Negro, Tío Cuchi, Estela, Maricela, Lucía, Xime, Eli, Yani, Rosana, Malena, Flavia, Nico, Damian y Juani

A mi ahijado Gael y mi sobrino (y ahijado) Juan Martin.

Y a quienes siempre estuvieron a mi lado: Mi hermana Camila y mis padres Hilda y Daniel.

Dedico este trabajo de tesis a la memoria de mi abuela Maria Dora Fleischmann, su recuerdo me ha acompañado en este arduo camino y me acompañará por siempre.

El presente trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Exactas Área Química fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Adriana Pinotti y la Dra. Sandra Rivero.

*Los resultados del trabajo de investigación derivaron en la escritura de este trabajo de tesis titulado **MATRICES BIODEGRADABLES COMO SOPORTES DE MICRO Y NANOPARTÍCULAS ACTIVAS PARA SU APLICACIÓN COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA**, se tradujeron en trabajos en congresos nacionales e internacionales, presentó una patente y trabajos en revistas referadas.*

Patente: Apósito funcionalizado con nano y microcápsulas de quitosano y PVA dispersas en una matriz de PVA para la dosificación de aceite esencial de cabreuva. Lamarra, J., Bucci, P., Giannuzzi, L., Montanari, J., Rivero, S., Pinotti, A. Patente en estado de revisión (2018).

Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. Lamarra, J., Rivero, S., y Pinotti, A. (2016). *Materials Science and Engineering: C*, 67, 717-726.

Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2017). *Materials Science and Engineering: C*, 79, 848-859.

Structural insight into chitosan supports functionalized with nanoparticles. Lamarra, J., Damonte, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2018). *Advances in Materials Science and Engineering*, 20, doi.org/10.1155/2018/3965783

Contenido

Antecedentes.....	2
La nanotecnología: un paradigma emergente tecnológico	2
Diseño de nanopartículas	2
La nanotecnología aplicada al mercado como estrategia de futuro	5
El quitosano aplicado a la nanotecnología	10
Obtención de nanoestructuras mediante procesos electrodinámicos	11
Conceptos aplicados a la problemática planteada en el desarrollo de la Tesis	13
OBJETIVO GENERAL	15
Referencias	16
Capítulo 1.....	22
1.1 Introducción.....	22
1.2 Materiales.....	27
1.3 Metodología y resultados obtenidos.....	27
1.3.1 Determinación de impurezas, cenizas y contenido de nitrógeno	27
1.3.2 Determinación de peso molecular y grado de deacetilación	29
1.3.3 Grado de desacetilación por potenciometría.....	33
1.3.4 ATR-FTIR.....	36
1.3.5 Análisis térmico a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	39
1.3.6 Difracción de rayos X (DRX)	45
Referencias	50
Capítulo 2.....	59
2.1 Introducción.....	59
2.2 Materiales y métodos	65
2.2.1 Caracterización de la suspensión de nanopartículas.....	66
2.2.1.1 Porcentaje de eficiencia de encapsulación (PEE)	66

2.2.1.2 Potencial zeta, tamaño de partícula e índice de polidispersidad	68
2.2.2 Estimación de las superficies de respuestas.....	71
2.2.2.1 Diseño experimental empleado.....	71
2.2.3 Análisis de la estabilidad de las suspensiones	75
2.2.4 Propiedades ópticas.....	76
2.2.5 Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR).....	76
2.2.6 Caracterización morfológica por TEM	77
2.2.8 Capacidad antioxidante del compuesto activo.....	78
2.2.9 Capacidad filmogénica	80
2.3 Resultados y discusión	80
2.3.1 Preparación y capacidad filmogénica de suspensiones de nanopartículas.....	80
2.3.2 Metodología de superficie de respuesta	84
2.3.3 Deseabilidad global.....	93
2.3.4 Caracterización óptica	94
2.3.5 Análisis del diámetro de partícula	102
2.3.6 Análisis mediante FTIR.....	107
2.3.7 Actividad antioxidante del ácido gálico	111
2.4 Conclusiones	113
Referencias	115
Parte I.....	125
3.1.1 Introducción.....	125
3.1.2 Materiales y métodos	129
3.1.2.1 Obtención de películas nanocompuestas.....	129
3.1.2.2 Propiedades físicoquímicas de las películas	131
3.1.2.3 Medida de ángulo de contacto.....	131
3.1.2.4. Propiedades de barrera	133
3.1.2.4.1. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	133

3.I.2.4.2. Permeabilidad al oxígeno (PO ₂)	134
3.I.3.5 Propiedades ópticas.....	135
3.I.2.6 Propiedades mecánicas	136
3.I.2.7 Capacidad antimicrobiana	137
3.I.2.8 Análisis estadístico	139
3.I.3 Análisis y discusión de resultados.....	139
3.I.3.1 Propiedades fisicoquímicas	139
3.I.3.2 Ángulo de contacto.....	141
3.I.3.3 Propiedades de barrera	143
3.I.3.5 Propiedades ópticas.....	145
3.I.3.6 Propiedades mecánicas	150
3.I.4.7 Propiedades antimicrobianas de las películas nanocompuestas	154
3.I.4. Conclusiones	161
PARTE II	162
3.II.1 Introducción.....	162
3.II.2. Materiales	166
3.II.3 Métodos.....	166
3.II.3.1 Microscopía electrónica de barrido.....	166
3.II.3.2 Análisis por ATR-FTIR	166
3.II.3.3 Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)	167
3.II.3.4. Experimentos de difusión	170
3.II.4 Resultados y discusión	171
3.II.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	171
3.II.4.2 Difracción de rayos X (DRX)	175
3.II.4.3 Análisis por ATR-FTIR	179
3.II.4.4. Aplicación de técnicas quimiométricas PCA y PLS.....	184
3.II.4.5. Estudios térmicos por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	187

3.II.4.5 Análisis por PALS.....	191
3.II.4.6. Modelado matemático del proceso de liberación.....	196
3.II.5. Conclusiones	205
PARTE III.....	207
3.III.1. Introducción.....	207
3.III.1.1 Ensamblado de materiales	207
3.III.1.2 Envases bicapa activos.....	210
3.III.1.3 Oxidación lipídica.....	210
3.III.2 Materiales y métodos	213
3.III.2.1 Ensamblado de películas para la obtención de sistemas bicapa.....	213
3.III.2.2 Caracterización de los sistemas bicapa	215
3.III.2.3 Aplicación de los sistemas bicapa.....	215
3.III.2.3.1 Obtención de harina de nuez y cuantificación del contenido de lípidos.....	215
3.III.2.3.2 Envasado.....	218
3.III.2.3.3 Cambios de calidad del producto durante el almacenamiento.....	218
3.III.2.3.3.1 Índice de peróxidos.....	219
3.III.2.3.3.2 Determinación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)	220
3.III.2.3.3.3 Análisis de las muestras mediante ATR-FTIR	222
3.III.3 Resultados y discusión	222
3.III.3.1 Propiedades fisicoquímicas	222
3.III.3.2 Propiedades ópticas.....	225
3.III.3.3 Propiedades mecánicas	227
3.III.3.4 Análisis térmico por MDSC	229
3.III.3.5 FTIR y análisis quimiométricos por PCA.....	234
3.III.3.6 Análisis microestructural	240
3.III.3.7 Capacidad antimicrobiana de los sistemas bicapa	242
3.III.3.8 Aplicación de los sistemas bicapa.....	244

3.III.4. Conclusiones	252
Capítulo 4.....	279
4.1. Introducción.....	279
4.1.1. Aceites esenciales	279
4.1.2. Difusión de aceite esencial en piel	281
4.2. Materiales	283
4.3. Metodología.....	283
4.3.1 Caracterización del aceite esencial de cabreuva (AE)	283
4.3.2 Análisis microbiológico del aceite esencial de cabreuva (AE)	284
4.3.2.1. Concentración mínima inhibitoria	284
4.3.2.2. Inhibición de bacterias en placas con AE.....	285
4.3.3 Formulación de las emulsiones.....	285
4.3.4 Estudio de las emulsiones.....	287
4.3.5 Síntesis de películas compuestas.....	288
4.3.6 Propiedades fisicoquímicas de las películas compuestas.....	289
4.3.7 Análisis estructurales, mecánicos y de barrera	289
4.3.8 Análisis espectroscópico	289
4.3.9 Aplicaciones de los apósitos desarrollados	289
4.3.9.1 Ensayos ex vivo	289
4.3.9.2 Cuantificación de la penetración del aceite esencial.....	291
4.3.9.3 Análisis difusivo del compuesto activo y seccionamiento óptico por CSLM	292
4.3.9.4 Ensayos de citotoxicidad.....	295
4.3.9.5 Ensayos de regeneración celular	296
4.3.9.6 Ensayos in vivo	297
4.4 Resultados y discusión	297
4.4.1 Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de cabreuva	297
4.4.2 Análisis de estabilidad de emulsiones	299

4.4.3 Caracterización de los apósitos desarrollados.....	306
4.4.3.1 Propiedades fisicoquímicas	306
4.4.3.2 ATR-FTIR.....	310
4.4.3.3 Propiedades mecánicas	313
4.4.3.4 Análisis térmico y microestructural	315
4.4.3.5 Análisis por microscopía electrónica	321
4.4.4 CMI del AE de cabreuva y capacidad antimicrobiana de los apósitos.....	323
4.4.5 Estudios de aplicación in vivo del apósito	327
4.4.6 Estudios de aplicación ex vivo del apósito.....	329
4.4.6.1 Penetración de aceite esencial en el explanto	329
4.4.7 Citotoxicidad sobre células de la línea HaCat-a.....	336
4.4.8. Ensayos de regeneración celular	339
4.5 Conclusiones	341
Referencias	342
Capítulo 5.....	353
5.1 Introducción.....	353
5.2 Materiales y métodos	357
5.2.1 Formulación de las soluciones.....	357
5.2.2 Formación de fibras por electrohilado	357
5.2.3 Propiedades reológicas de las soluciones.....	360
5.2.4 Caracterización de la morfología y tamaño de las fibras.....	360
5.2.5 Caracterización de las nanoestructuras obtenidas.....	361
5.3 Resultados.....	361
5.3.1 Comportamiento reológico de las soluciones	361
5.3.2 Morfología de las fibras	364
5.3.3 Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua	370
5.3.4 Análisis por DRX	371

5.3.5 Análisis térmico (TGA y DSC).....	373
5.3.6 ATR-FTIR.....	375
5.3.7. Capacidad antimicrobiana de las fibras.....	377
5.4 Conclusiones	379
Referencias	380
Anexo Biodegradación	385
A.1 Introducción	385
A.2 Materiales.....	387
A.2.1 Evaluación de la biodegradación en suelo de las películas a base de quitosano	387
A.3 Resultados	389
Referencias	397
CONCLUSIONES GENERALES	399

Índice de Tablas

Tabla 1.....	7
Tabla 2.....	8
Tabla 3.....	10
Tabla 2.2.....	85
Tabla 3.I.1.....	139
Tabla 3.I.2.....	142
Tabla 3.I.3.....	145
Tabla 3.I.4.....	147
Tabla 3.I.5.....	149
Tabla 3.I.6.....	151
Tabla 3.I.7.....	156
Tabla 3.I.8.....	157
Tabla 3.I.9.....	158

Tabla 3.I.10.....	160
Tabla 3.II.1.....	199
Tabla 3.III.1.....	223
Tabla 3.III.2.....	225
Tabla 3.III.3.....	227
Tabla 3.III.4.....	231
Tabla 3.III.5.....	232
Tabla 4.1.....	286
Tabla 4.2.....	288
Tabla 4.3.....	298
Tabla 4.4.....	299
Tabla 4.5.....	307
Tabla 4.6.....	309
Tabla 4.7.....	313
Tabla 4.8.....	317
Tabla 4.9.....	326
Tabla 4.10.....	336
Tabla 5.1.....	363
Tabla 5.2.....	371
Tabla 5.3.....	378

Indice de Figuras

Figura 1	3
Figura 1.1	23
Figura 1.2	26
Figura 1.3	33

Figura 1.4	35
Figura 1.5	37
Figura 1.6	38
Figura 1.7	42
Figura 1.8	44
Figura 1.9	46
Figura 1.10	47
Figura 1.11	49
Figura 2.1	59
Figura 2.2	61
Figura 2.3	62
Figura 2.4	65
Figura 2.5	67
Figura 2.6	68
Figura 2.7	70
Figura 2.8	72
Figura 2.9	75
Figura 2.10	78
Figura 2.11	79
Figura 2.12	82
Figura 2.13	83
Figura 2.14	89
Figura 2.15	92
Figura 2.16	96
Figura 2.17	97
Figura 2.18	100
Figura 2.19.	102

Figura 2.20	103
Figura 2.21	105
Figura 2.22	106
Figura 2.23	108
Figura 2.24	109
Figura 2.25	111
Figura 2.26	112
Figura 3.I.1	127
Figura 3.I.2	130
Figura 3.I.3	132
Figura 3.I.4	134
Figura 3.I.5	135
Figura 3.I.6	149
Figura 3.I.7	154
Figura 3.II.1	163
Figura 3.II.2	168
Figura 3.II.3	169
Figura 3.II.4	171
Figura 3.II.5	172
Figura 3.II.6	172
Figura 3.II.7	173
Figura 3.II.8	174
Figura 3.II.9	176
Figura 3.II.10	178
Figura 3.II.11	180
Figura 3.II.12	182
Figura 3.II.14	184

Figura 3.II.15	186
Figura 3.II.16	187
Figura 3.II.17	188
Figura 3.II.18	189
Figura 3.II.19	191
Figura 3.II.20	193
Figura 3.II.21	194
Figura 3.II.19	197
Figura 3.II.22	204
Figura 3.III.1	208
Figura 3.III.2	211
Figura 3.III.3	214
Figura 3.III.4.	216
Figura 3.III.5	218
Figura 3.III.6	221
Figura 3.III.7	226
Figura 3.III.8	228
Figura 3.III.9	230
Figura 3.III.10	232
Figura 3.III.11	234
Figura 3.III.12	235
Figura 3.III.13	237
Figura 3.III.14.	238
Figura 3.III.15	239
Figura 3.III.16	240
Figura 3.III.17	241
Figura 3.III.18	242

Figura 3.III.19.	243
Figura 3.III.20.	243
Figura 3.III.21.	246
Figura 3.III.22.	249
Figura 4.1.	280
Figura 4.2.	282
Figura 4.3.	286
Figura 4.4.	287
Figura 4.5.	291
Figura 4.6.	293
Figura 4.7.	295
Figura 4.8.	302
Figura 4.9.	304
Figura 4.10.	305
Figura 4.11.	306
Figura 4.12.	311
Figura 4.13.	312
Figura 4.14.	314
Figura 4.15.	316
Figura 4.16.	319
Figura 4.17.	320
Figura 4.18.	322
Figura 4.19.	324
Figura 4.20.	327
Figura 4.21.	328
Figura 4.22.	329
Figura 4.23.	330

Figura 4.24	332
Figura 4.25	333
Figura 4.26	334
Figura 4.27	335
Figura 4.28	338
Figura 4.29	339
Figura 4.30.	340
Figura 5.1	354
Figura 5.2	358
Figura 5.3	359
Figura 5.4	362
Figura 5.5	364
Figura 5.6	366
Figura 5.7	367
Figura 5.8	369
Figura 5.9	370
Figura 5.10	372
Figura 5.11.	373
Figura 5.12	375
Figura 5.13	376
Figura A.1	385
Figura A.2	388

RESUMEN

En la actualidad hay un creciente interés en aplicar nuevas tecnologías que permitan la obtención de materiales no tradicionales, biodegradables y sustentables. El quitosano es un material biocompatible, biodegradable, no-tóxico, que permite un aprovechamiento integral y eficiente de los recursos. Asimismo, el PVA es un polímero sintético biodegradable, soluble en agua. Ambos tienen diversas aplicaciones tanto en el campo de la biotecnología, la medicina, como en la industria alimentaria y en el área farmacéutica, cosmética, y de tecnología de envases. En esta dirección, la nanotecnología constituye una plataforma tecnológica que ha demostrado tener potencial para producir productos innovadores con considerables beneficios para la salud humana y actualmente ofrece nuevas oportunidades para la innovación en la industria alimentaria y sectores afines. Si bien las aplicaciones y los productos concebidos y realizados sobre su base en el sector alimentario apenas han empezado a desarrollarse, los ámbitos de uso son extremadamente variados y permitirían satisfacer distintos tipos de necesidades.

Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo del presente trabajo de Tesis fue diseñar materiales nanoestructurados funcionalizados a base de quitosano y polímeros sintéticos biocompatibles a efectos de modular la liberación de compuestos activos, y aplicarlos tanto a un alimento susceptible de oxidación lipídica como a muestras dérmicas en los casos que se usen como apósitos

En este marco, el diseño de nanopartículas de quitosano funcionalizadas, permitió diseñar sistemas de nanoencapsulación capaces de vehiculizar ácido gálico, compuesto con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Las nanopartículas fueron ensambladas con un soporte de quitosano capaz de actuar como un dispositivo de liberación controlada, que permitió la dosificación del compuesto de una forma lenta y sostenida en el tiempo. La capacidad de modular la liberación le confirieron una mejor eficacia y dosis menores para lograr resultados similares a los de los sistemas convencionales (inclusión directa de ácido gálico en una matriz de quitosano).

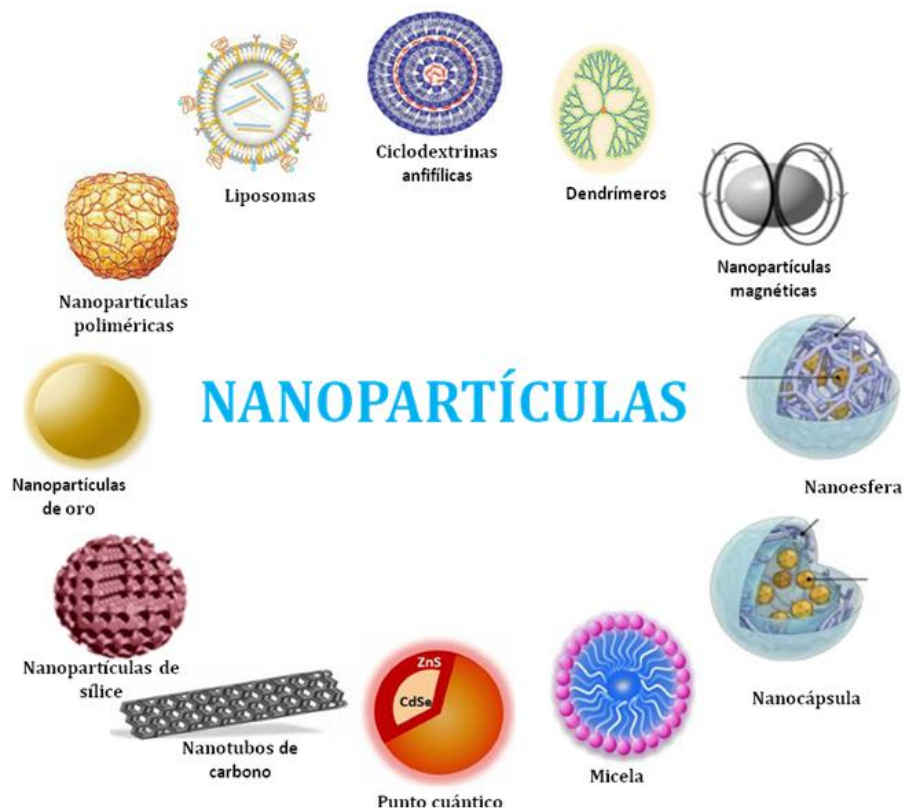
Por otra parte, en la búsqueda de mejores propiedades en la conservación de productos alimenticios, se desarrolló un sistema bicapa mediante termocompresión

capaz de otorgar estabilidad oxidativa a muestras de harina de nuez envasadas durante su almacenamiento bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

Explorando aplicaciones en otros campos, si bien la cicatrización de heridas leves es un fenómeno natural, la aplicación de un apósito que garantice el control del crecimiento bacteriano hasta que se produzca la reepitelización espontánea puede acelerar y/o mejorar el proceso. Actualmente existe una tendencia creciente a la utilización de compuestos naturales para aplicaciones tópicas. La inclusión de aceite esencial de cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*) en un soporte polimérico se presentó como una alternativa para preservar las propiedades del compuesto activo además de garantizar su dosificación en un explanto. Los apósitos desarrollados permitieron la penetración del compuesto activo por la vía tópica que presentó características fisicoquímicas que facilitaron su penetración por la barrera impermeable del estrato córneo llegando a la epidermis viable.

Asimismo, se puso a punto la técnica de electrohilado con un equipo de construcción casera. En línea con las aplicaciones en el campo biomédico o cosmético, la posibilidad de crear nuevas estructuras y productos abre las puertas a un nuevo horizonte tecnológico permitiendo el diseño de nanoestructuras fibrosas funcionalizadas mediante una técnica de gran versatilidad.

Antecedentes



Antecedentes

La nanotecnología: un paradigma emergente tecnológico

Mucha agua bajo el puente ha corrido desde que el investigador japonés Norio Taniguchi acuñó el término nanotecnología para describir la ingeniería de precisión con tolerancia de un micrón o menos (Taniguchi, 1974). La nanotecnología ha sido definida por la *British Standards Institution* como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de forma y tamaño a escala nanométrica, que cubre el rango de tamaño de aproximadamente 1 a 100 nm (BSI, 2009; Park, 2013). El desarrollo de materiales a este nivel, permite modificar y controlar las propiedades y funciones de la materia, además de diseñar productos para fines específicos.

La nanotecnología propone la reconfiguración atómica y molecular de la materia con propósitos definidos y usos potenciales en diferentes áreas. Debido a la interdisciplinariedad que se establece entre los campos científicos y tecnológicos se abren grandes oportunidades de investigación y desarrollo, así como potenciales paradigmas en áreas como materiales y manufacturas, medicina y salud, medio ambiente y energía, biotecnología y agricultura, electrónica y tecnologías de la información. Por lo tanto, sus efectos estarán en función de lo que pueda significar la combinación de influencias de las diferentes disciplinas que convergen (Guzmán Chávez y Toledo Patiño, 2009).

Diseño de nanopartículas

En la actualidad se distinguen, de manera general, dos tipos o dos vías de desarrollo nanotecnológico. Se trata de construir desde abajo (átomos y moléculas) hacia arriba (producto final), proceso *bottom-up*, en lugar de diseñar y construir un producto en el cual cada átomo y enlace químico está precisamente especificado, proceso *top-down*. En los denominados métodos *bottom-up* se construyen estructuras complejas a partir de otras más simples mediante, por ejemplo, técnicas de autoensamblado. Por otra parte, en los métodos *top-down* se parte de sistemas de complejidad o tamaño mayores y éstos se van reduciendo hasta alcanzar las dimensiones deseadas. Los métodos más usados, por

su rapidez, simplicidad y por la calidad de las nanoestructuras obtenidas, son los métodos *bottom-up* (Ouahid Hessissen, 2016).

Desde este punto de vista, el desarrollo de nanopartículas desde un enfoque *top-down* incluye la separación de partículas más grandes para crear nanoestructuras. Este sistema es especialmente adecuado para hacer estructuras interconectadas e incorporadas, por ejemplo, en hardware electrónico. En el enfoque *bottom-up* mediante la síntesis química o auto-ensamblaje de compuestos más pequeños los átomos y moléculas individuales se ensamblan en nanoestructuras más grandes.

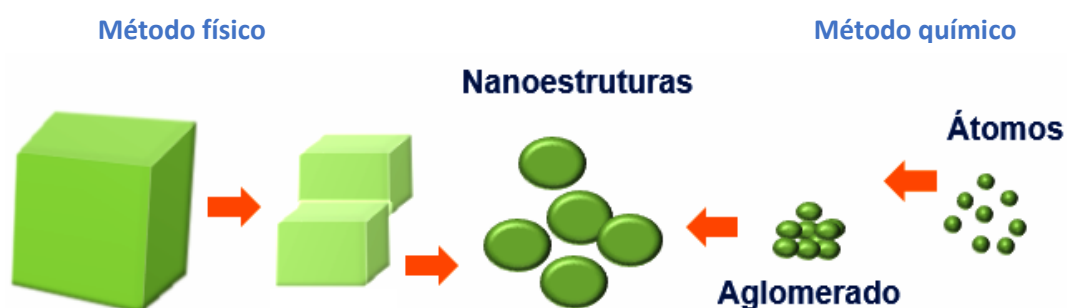


Figura 1. Representación esquemática de las distintas vías preparación de nanopartículas, adaptado de Gómez-Garzón (2018) y Makarov y col. (2014).

En bibliografía se describen un gran número de métodos físicos, químicos, biológicos o combinaciones de estos que permiten obtener distintos tipos de nanopartículas (Pal y col., 2011). Los métodos físicos y químicos son los más empleados en la síntesis de nanopartículas debido a su potencial para controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y morfología. Asimismo, en la funcionalización de estas nanoestructuras se debe tomar en consideración que las partículas pueden interaccionar con compuestos activos mediante dos mecanismos:

- 1) Como señalizadores superficiales o nanoesferas, donde el componente se encuentra disperso en la superficie o matriz polimérica.
- 2) Como acarreadores o nanocápsulas, que son sistemas de tipo reservorio, donde el componente se encuentra en la cavidad central, cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación. La selección del tipo de nanopartícula, dependerá

de las necesidades de uso, de las propiedades fisicoquímicas del polímero y de las características de la molécula empleada.

Las nanopartículas funcionalizadas con compuestos activos han atraído mucha atención, sobre todo en el campo farmacéutico, biomédico (Pinto y col., 2006), cosmético (Guterres y col., 2007) e industrias de alimentos (Barbosa-Pereira y col., 2014), debido a sus características funcionales. Estas nanoestructuras también han sido usadas como encapsulantes para proteger compuestos bioactivos del contacto directo con condiciones severas, como luz, calor y oxígeno (Woranuch y Yoksan, 2013). Además, funcionan como un vehículo para dosificar los compuestos activos a los puntos objetivo, y de manera concomitante controlar la liberación para alcanzar un efecto sostenido y eficaz (Barbosa-Pereira y col., 2014). Son especialmente importantes en el caso de compuestos bioactivos como vitaminas, probióticos, péptidos bioactivos, antioxidantes, enzimas y proteínas, los cuales proporcionan beneficios fisiológicos o reducen los riesgos de desarrollar enfermedades.

La nanotecnología también ha sido aplicada para proteger a los aceites esenciales de los efectos ambientales adversos a través de la encapsulación del principio activo en nanopartículas ofreciendo numerosos beneficios como fácil manejo, protección contra la oxidación, mejora de la estabilidad, enmascaramiento del gusto, liberación controlada, vehiculización de múltiples ingredientes activos (Keawchaoon y Yoksan, 2011). Los efectos secundarios beneficiosos son reducción de la toxicidad, aumento de la solubilidad en agua de ingredientes hidrófobos, mejoramiento de la eficiencia y la biodisponibilidad (Woranuch y Yoksan, 2013).

Por otra parte, la nanociencia y la nanotecnología proporcionan nuevas alternativas en el desarrollo de alimentos, especialmente en la incorporación de compuestos bioactivos sin afectar la percepción sensorial del consumidor y obtener la mejora efectiva de la encapsulación de componentes activos. Los sistemas de nanoencapsulación se utilizan como una forma de liberar y proteger el compuesto bioactivo en una forma física que se puede incorporar fácilmente a los alimentos o bebidas (Singh, 2016).

Una alternativa para proteger estas moléculas es el uso de sistemas nanoestructurados incluyendo liposomas, nanoemulsiones, microemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas,

nanopartículas de polímero. En particular en alimentos, el empleo de nanopartículas comestibles como sistemas de liberación tiene una amplia variedad de aplicaciones (Matalanis y col., 2011). En este sentido, la dispersabilidad, la estabilidad y la biodisponibilidad de muchos compuestos bioactivos pueden ser mejorados mediante la encapsulación (Wang y col., 2014). Las vitaminas son compuestos que presentan desafíos debido a su alta sensibilidad y baja estabilidad en condiciones ambientales inadecuadas condiciones (temperatura, oxígeno, luz y humedad), y esto conduce a la búsqueda de nuevas estrategias de liberación. Además, en este punto conviene detenerse para remarcar la importancia del estudio de la cinética de liberación de los compuestos bioactivos incorporados en un sistema. Esta, depende de múltiples factores fisicoquímicos y fisiológicos, así como de la técnica utilizada para ensamblar el compuesto. En este sentido, una estrategia para dilucidar el/los mecanismos de liberación de un compuesto activo, es la utilización de herramientas matemáticas y estadísticas que permitan el ajuste y comparación de modelos con el fin de determinar los mecanismos de liberación que influyen en una aplicación en particular. Los modelos teóricos, empíricos y semi-empíricos tienen ventajas y desventajas dependiendo de su aplicación, sin embargo, todos ellos son herramientas valiosas para la interpretación de los fenómenos físicos, químicos y biológicos, debido a la interacción entre el compuesto activo, matriz soporte y medio de liberación (Flores y Kong, 2017).

Las principales ventajas que presenta la nanotecnología derivan de las mejores o novedosas funcionalidades de los nanomateriales, que tienen una superficie mucho más elevada en proporción a la masa si se comparan con sus homólogos ordinarios. Durante los últimos años, las industrias alimentarias han sido testigos de la integración de la nanotecnología a alimentos y materiales para el envasado de alimentos, los que han ido cambiando con el tiempo, se han vuelto más resistentes pero más ligeros, con materiales de envasado reciclables y funcionales.

La nanotecnología aplicada al mercado como estrategia de futuro

Actualmente hay más de 300 productos de nano-alimentos disponibles en el mercado en todo el mundo, entendiendo como nano-alimento cuando se usan nanopartículas, y/o técnicas o herramientas provenientes de la nanotecnología durante el cultivo,

producción, transformación o envasado de un alimento (Asiamah, 2013). Estos avances desde el punto de vista tecnológico han fomentado un gran aumento de las inversiones en I+D en nano-alimentos. Hoy en día, el impacto de la nanotecnología va desde los alimentos básicos hasta alimentos altamente procesados, desde la liberación de agentes activos hasta el diseño de envases inteligentes. Existe una fuerte necesidad de desarrollar nano-alimentos a través de la nanoingeniería de los ingredientes alimenticios. Bajo esta premisa, la textura, el sabor, y el color de los ingredientes de los alimentos pueden modificarse mediante nanoingeniería sin perder de vista su valor nutricional o con mejor calidad nutricional. La nanotecnología puede extender la vida útil de productos perecederos como frutas, verduras y flores durante el transporte, evitando así las pérdidas post-cosecha.

Algunas de las compañías de alimentos más grandes del mundo, incluidas Heinz, Nestlé, Unilever y Kraft, están explorando las posibilidades que ofrece la nanotecnología para el procesamiento y envasado de alimentos. En la Tabla 1 y 2 se presentan ejemplos de nanoprodutos disponibles en el mercado. Una encuesta mostró que si bien los consumidores son críticos con el uso de la nanotecnología en los alimentos, existe una aceptación relativamente alta de su utilización en los envases para alimentos.

Relevamientos realizados por Siegrist y col. (2007) demostraron que los beneficios del envasado con incorporación de nanotecnología eran percibidos por los consumidores como mayores que los de los alimentos que contenían nanomateriales.

Tabla 1. Aplicaciones de nanomateriales en agricultura, alimentos y envasado de alimentos. Adaptada de Asiamah (2013)

Tipo de producto	Nombre del producto y fabricante	Componente nano	Finalidad
Suplemento nutricional	Polvo „Mycrohydrin“ de la línea de productos Nanoceuticals / compañía RBC Lifesciences.	Jaulas moleculares de 1-5 nm de diámetro, hechas a partir de un complejo de hidruro de sílice.	La Mycrohydrin nanoscópica presenta mayor potencia y biodisponibilidad incrementada. Al ser expuesta a la humedad, libera iones de hidrógeno y actúa como un potente antioxidante.
Bebida nutricional	Oat Chocolate Nutritional Drink Mix (mezcla para bebida nutricional sabor chocolate y avena) / compañía Toddler Health.	Partículas de hierro de 300nm (SunActive Fe)	Las partículas nanoscópicas de hierro tienen mayor reactividad y biodisponibilidad.
Material en contacto con alimentos (artículos de cocina)	Tabla para picar Nano Silver / compañía A-Do Global.	Nanopartículas de plata	Las partículas nanoscópicas de plata tienen mayores propiedades antibacterianas.
Material en contacto con alimentos (utensilios de cocina)	Antibacterial Kitchenware (utensilios de cocina antibacterianos) / compañía Nanocaretech/NCT.	Nanopartículas de plata	Las partículas nanoscópicas de plata tienen mayores propiedades antibacterianas.
Envasado de alimentos	Adhesivo para recipientes de hamburguesas de McDonald's / compañía Ecosynthetix	Nanoesferas de almidón de 50-150nm	Estas nanopartículas tienen una superficie 400 veces mayor a la de las partículas naturales de almidón. Cuando se utilizan como adhesivo requieren menos agua y por ende menos tiempo y energía para secarse.

Tabla 2. Aplicaciones de nanomateriales en agricultura, alimentos y envasado de alimentos. Adaptada de Asiamah (2013)

Tipo de producto	Marca y fabricante	Componente nano	Finalidad
Envasado de alimentos	Envoltorio plástico Durethan KU 2-2601 / compañía Bayer	Nanopartículas de sílice en un nanocompuesto polimérico.	Las nanopartículas de sílice en el plástico impiden que penetre oxígeno y gas por el envoltorio, alargando así el tiempo de conservación del producto.
Aditivo alimentario Conservante	Aquasol / compañía AquaNova	Micela (cápsula) nano escalar de sustancias lipófilas o insolubles en agua.	Al encerrar los ingredientes activos en nanocápsulas solubles, se aumenta su absorción en el cuerpo (incluido células individuales).
Tratamiento de crecimiento vegetal	PrimoMaxx / compañía Syn-genta	Emulsión de partículas de 100nm.	El empleo de partículas nanoscópicas aumenta la potencia de los ingredientes activos, reduciendo potencialmente la cantidad que se debe aplicar.
Envases inteligentes	CSP Technologies	Polímero capaz de liberar ingredientes en alimentos o bebidas en respuesta a un estímulo externo.	Controlar la humedad, el oxígeno, las bacterias, el olor y hasta el sabor de los alimentos mismos.
Nanosensor	Kraft	Lengua electrónica de base nano-sensor capaz de percibir el sabor de sustancias químicas a nivel de partes por trillón, para luego guiar la liberación.	Controlar la liberación de aromas, sabores y nutraceuticos en productos alimentarios en respuesta a las preferencias particulares de cada consumidor.
Envase activo	Materiales nanocompuestos basados en sales generadoras de SO ₂ y EDTA/Nanobiomatters Research & Development	Nanoarcillas que contienen sales generadoras de SO ₂ y sales de EDTA	Controlar la liberación de SO ₂ para producir un embase con capacidades antimicrobianas y absorbedoras de O ₂

Otro aspecto a contemplar es la aplicación de la nanotecnología en áreas de cosmética y cuidado personal. Cosmecéuticos son los productos cosméticos que incorporan un ingrediente biológicamente activo con beneficios terapéuticos sobre la superficie aplicada (Kaul y col., 2018). Los productos cosmeceuticos están entre los productos farmacéuticos y los de cuidado personal. Se caracterizan por exhibir una eficacia terapéutica mensurable en la piel, ya que los fármacos y formulaciones se han diversificado y se utilizan para el tratamiento de diversas afecciones como daño al cabello, arrugas, foto-envejecimiento, sequedad de la piel, manchas oscuras, hiperpigmentación, entre otras (Srinivas, 2006). Diversas clases de nanoportadores como liposomas, niosomas, nanopartículas lipídicas sólidas, portadores de lípidos nanoestructurados, nanoemulsiones, son utilizados para la liberación de nanocosmeceólogos. Estos nanoportadores hacen que las formulaciones para el cuidado de la piel sean más efectivas y aumentan la eficacia de los filtros solares mejorando la protección UV. Al tener un tamaño de partículas pequeño, se aumenta la superficie que permite el transporte de los compuestos bioactivos a la piel. La oclusión proporciona mejoras en la penetración y la hidratación de la piel. Los cosmeceuticos tienen una alta eficiencia de encapsulación, buenas propiedades sensoriales y son más estables que los cosméticos convencionales. La mayoría de las nanopartículas son aptas para la administración de medicamentos lipofílicos e hidrofílicos.

Existen varios niosomas cosmeceuticos disponibles en el mercado, crema hidratante, cremas antiarrugas, champú reparador del cabello y acondicionador. En La Tabla 3 se presentan los usos de diversos productos cosmeceuticos comercializados.

Los niosomas fueron desarrollados por L’Oreal en el año 1970 en base a investigación y el desarrollo de liposomas sintéticos, patentados en el año 1987 y desarrollados bajo el nombre comercial de *Lancome*. Los niosomas se definen como vesículas que tienen una estructura bicapa que resultan del auto-ensamblaje de tensoactivos no iónicos hidratados, con o sin incorporación de lípidos (Karim y col., 2010).

Tabla 3. Aplicaciones de nanomateriales en productos cosméticos. Adaptada de Asiamah (2013)

Nombre del producto	Marca	Usos
Niosome+Perfected age treatment	Lancome	Antiarrugas
Niosome	Lancome	Crema base, limpieza de piel
Mayu niosome base cream	Laon Cosmetics	Humectante y aclarante
Anti-age response cream	Simply Man Match	Tratamiento de arrugas
Identikit masque floral repair	Identikit	Máscara reparadora de cabello
Identikit shampooing floral repair	Identikit	Shampoo reparador
Eusu niosome makan pom whitening facial cream	Eusu	Aclarante de piel

El quitosano aplicado a la nanotecnología

En cuanto a la naturaleza fisicoquímica de los polímeros, se han utilizado varios materiales en el proceso de nanoencapsulación, ya que los métodos individuales de encapsulación son adaptables a todas las aplicaciones del producto o material de pared utilizado (Rosales-Martínez y col., 2018). En este sentido la composición del polímero (carga superficial, hidrofobicidad y perfil de biodegradación), de las nanopartículas y compuestos bioactivos (peso molecular, carga) ejerce una gran influencia en la absorción del compuesto, patrón de biodistribución, y eliminación (Reis y col., 2006). Además, se ha despertado un gran interés en el diseño y estudio de nanopartículas poliméricas coloidales obtenidas con polisacáridos, lípidos y biopolímeros de fuentes naturales. La interacción entre los biopolímeros biodegradables catiónicos y aniónicos conduce a la formación de hidrogeles que han demostrado características favorables para la encapsulación y liberación del compuesto activo.

Uno de los biopolímeros catiónicos pseudonatural más estudiados es el quitosano (Douglas y Tabrizian, 2005). Entre los métodos más comúnmente utilizados para la formación de micro- y nanopartículas de quitosano se encuentran el entrecruzamiento, coacervación, secado por pulverización (*spray dry*), técnica de coalescencia de emulsión, gelación iónica, técnica de micela inversa, y tamizado (Agnihotri y col., 2004). Los estudios

sobre quitosano abarcan diferentes áreas y se presentan bajo diferentes formas, películas funcionalizadas, películas nanocompuestas, multicapas, nanopartículas, nanoemulsiones, entre otras. Estas estructuras se pueden funcionalizar con distintos compuestos activos dependiendo el campo de aplicación. En este sentido, el aceite esencial de *Carum copticum* fue combinado con nanopartículas de quitosano obtenidas por gelación iónica utilizando tripolifosfato de sodio y hexametáfosfato sódico como agentes entrecruzantes. Las propiedades biológicas del aceite esencial antes y después del proceso de encapsulación fueron determinadas por FTIR y análisis térmico, concluyendo que el aceite esencial había sido encapsulado en las nanopartículas de quitosano. La estructura y las funciones de los compuestos activos presentes en el aceite no se modificaron con el proceso de encapsulación, manteniendo sus propiedades antibacterianas y antioxidantes (Esmaeili y Asgari, 2015). Asimismo, el quitosano tiene excelentes propiedades filmogénicas y por lo tanto, se utiliza como material en la liberación de medicamentos (Agnihotri y col., 2004). Aresta y col. (2013) evaluaron el potencial de nanopartículas de quitosano cargadas con vitamina y su aplicación en envases para alimentos y Avadi y col. (2010) utilizaron goma arábica como polianión con buenos resultados para encapsular insulina en quitosano. Asimismo, Azevedo y col. (2014) estudiaron la encapsulación y liberación controlada de vitamina B2 desde nanopartículas de alginato/quitosano.

Las micropartículas recubiertas con quitosano tienen muchas ventajas, como el aumento en la capacidad de carga de droga, propiedades bioadhesivas y de liberación controlada de agentes activos. Chandy y col. (2002) prepararon microesferas con mezclas de ácido poliláctico y poli(caprolactona) recubiertas de quitosano. Estas microesferas mostraron un buen potencial para la liberación selectiva de agentes antiproliferativos para tratar restenosis.

Obtención de nanoestructuras mediante procesos electrodinámicos

Dentro del campo de la nanotecnología el procesamiento mediante electrohilado o *electrospinning* constituye uno de los métodos electrodinámicos de vanguardia que permite la producción de nanofibras a partir de diferentes polímeros. Es una técnica eficiente para la fabricación de nanoestructuras ultrafinas ensambladas con diámetros del orden de los nanómetros. En la actualidad, existe un creciente interés en el diseño de

nanoestructuras fibrosas, siendo una de las principales aplicaciones la encapsulación de compuestos bioactivos como enzimas, antioxidantes, antimicrobianos, sabores y aromas. El electrohilado constituye una de las técnicas electrodinámicas más utilizada para la obtención de nanofibras a base de polímeros sintéticos o naturales a nivel académico e industrial, es considerada una técnica de procesamiento simple y directo, de bajo costo y fácilmente escalable (Soto Martínez y col., 2017).

La selección adecuada de los parámetros de procesamiento permite controlar las dimensiones de las fibras, su morfología y sus propiedades (Meng y col., 2011; Zhuang y col., 2010). Las variables del proceso dependen de las propiedades del polímero (peso molecular, solubilidad), de la solución (concentración, viscosidad, conductividad y tensión superficial), de los factores del proceso (velocidad de flujo, voltaje, diámetro de la aguja y distancia entre la punta y el colector) y ambientales (temperatura, humedad y presión atmosférica) (Karimi y col., 2015; Li y Wang, 2013; Meng y col., 2011; Yan y col., 2013; Zhuang y col., 2010). Por otra parte, la posibilidad de desarrollar estructuras secundarias tales como nanofibras con estructura de núcleo y revestimiento, nanofibras huecas o nanofibras porosas, membranas y tubos, amplía aún más la versatilidad de la técnica (Caracciolo y col., 2011; 2013). Las fibras obtenidas son estructuras ultrafinas con diámetros por debajo de los 100 nm y una relación de aspecto generalmente mayor que 50 (Soto Martínez y col., 2017). Poseen una gran área superficial por unidad de masa y un tamaño reducido de poros producto de la superposición de fibras favoreciendo la formación de una matriz interconectada (Persano y col., 2013). Las nanofibras poliméricas son materiales promisorios para diversas aplicaciones como liberación de compuestos, ingeniería de tejidos y apósitos para heridas (esparadrapos), debido a su alta relación área superficial-volumen, flexibilidad y propiedades mecánicas.

La posibilidad de producir fibras de distintos materiales, con morfología y porosidad a medida, sumado a las excelentes propiedades intrínsecas a su tamaño, hacen que estas estructuras resulten apropiadas en diversos campos de la investigación biomédica tales como liberación controlada y localizada de principios activos, ingeniería de tejidos, modificación superficial de implantes y apósitos para heridas (esparadrapos) (Nagy y col., 2015). El diseño de matrices con nanofibras como estrategia para la dispersión de principios activos presenta una enorme potencialidad para la dosificación compuestos.

Existen en el mercado sistemas que utilizan nanofibras en dispositivos para la liberación controlada de fármacos. La incorporación del compuesto activo en la matriz polimérica de las fibras permite su protección favoreciendo su vehiculización controlada y localizada (Duque Sánchez y col., 2013). En otras palabras, estos sistemas permiten la liberación de una droga en un sitio específico, un beneficio buscado para evitar los efectos secundarios de esa droga en otros tejidos. Se utilizan también para aplicaciones tópicas donde una estructura en forma de malla o red compuesta por nanofibras se coloca directamente sobre la piel sana, sobre heridas o quemaduras que la droga atraviesa para ingresar hasta su sitio de acción. Estos parches ya se utilizan para tratar tabaquismo e hipertensión, y para la administración de analgésicos postoperatorios, entre otros. Cuando el sistema se coloca sobre heridas y quemaduras, no solo permite la dosificación del fármaco deseado de manera controlada, sino que también actúa como una barrera de protección de la zona tratada. Los apósitos han atraído gran atención ya que provén una barrera física contra infecciones secundarias, excelente permeabilidad al oxígeno, buen drenaje de fluidos, inhibición de microorganismos exógenos y un ambiente fisiológicamente compatible (Caracciolo y col., 2011; Shahzad y col., 2015).

En este sentido, el diseño de matrices nanoestructuradas como estrategia para la dispersión, adsorción o inmovilización de principios activos presenta una enorme potencialidad para la dosificación controlada y localizada de compuestos (Duque Sánchez y col., 2013).

Conceptos aplicados a la problemática planteada en el desarrollo de la Tesis

Se realizó una caracterización fisicoquímica y estructural del quitosano por ser un polímero proveniente de distintas fuentes de la biomasa, que no posee una composición única y presenta gran variabilidad debido a su origen y condiciones de obtención las cuales definen las propiedades finales del producto y sus potenciales aplicaciones. La nanotecnología constituye una plataforma tecnológica que ha demostrado tener potencial para producir productos innovadores con considerables beneficios para la salud humana y actualmente ofrece nuevas oportunidades para la innovación en la industria alimentaria y sectores afines. Como una alternativa sustentable y desde una perspectiva tecnológica, este estudio contempla el desarrollo de nanopartículas de quitosano

mediante un proceso *bottom-up* cargadas con compuestos antioxidantes como ácido gálico. Estas estructuras se ensamblaron en matrices soporte de quitosano para obtener matrices nanocompuestas. Estos materiales constituyen un grupo de naturaleza híbrida que resultan del ensamblado de dos fases (relleno-matriz) obteniendo materiales con propiedades ajustadas. La capacidad de fabricar y controlar la composición de polímeros a dimensiones de nanoescala, combinado con el interés en aplicar la nanotecnología a diferentes áreas, condujo a la reducción de los sistemas de liberación controlada desde macro o microescala a nanoescala (Kamali y col., 2016). En este sentido, la obtención de estructuras nanocompuestos a base de quitosano como dispositivos de liberación controlada resulta una opción innovadora que se explora en el presente trabajo.

Por otra parte, en la búsqueda de mejores propiedades en la conservación de productos alimenticios, se han desarrollado envases bicapa en los cuales componentes activos incorporados permiten funcionalizar las matrices poliméricas. Resulta de particular interés la utilización de la técnica de termo-compresión que promueve una producción escalable para la obtención sistemas bicapas ensamblando matrices nanocompuestas de quitosano y alcohol polivinílico. En el presente trabajo se propone la aplicación de los sistemas bicapa a un alimento susceptible de sufrir oxidación lipídica.

La nanotecnología ha abierto ventanas para introducir otras funcionalidades, como compuestos antimicrobianos y antioxidantes en los materiales biodegradables. Se trata de un ámbito emergente de investigación y desarrollo con la posible aplicación de la nanotecnología para mejorar las propiedades y funcionalidad de los materiales biodegradables. En los últimos años en el campo biomédico se han investigado nuevas formas de incorporar los compuestos activos a sistemas complejos con el fin de preservar sus propiedades y garantizar una liberación controlada y sostenida. Si bien la cicatrización de heridas leves es un fenómeno natural, la aplicación de un apósito que garantice el control del crecimiento bacteriano hasta que se produzca la reepitelización espontánea puede acelerar y/o mejorar el proceso, haciéndolo más confortable para el ser humano.

Actualmente existe una tendencia creciente a la utilización de compuestos naturales para aplicaciones dérmicas. El empleo de aceites esenciales para uso externo es conocido pero su aplicación en forma directa conlleva el peligro de irritación de la piel. Asimismo,

los aceites esenciales son compuestos volátiles. En consecuencia, la inclusión del aceite esencial en un soporte polimérico constituye una estrategia que permitiría superar las dificultades mencionadas.

La construcción de un prototipo que emplea procesos electrodinámicos para la obtención de nanofibras es otro de los enfoques planteados en el presente trabajo de Tesis. Se busca obtener un material nanoestructurado controlando las variables del proceso. Esta investigación, también busca incentivar el desarrollo de herramientas tecnológicas para el diseño de biomateriales.

Teniendo en cuenta las premisas anteriormente expuestas se propone como:

OBJETIVO GENERAL

Diseñar materiales nanoestructurados funcionalizados a base de quitosano y polímeros sintéticos biocompatibles a efectos de modular la liberación de compuestos activos y aplicarlos tanto a un alimento susceptible de sufrir oxidación lipídica como a muestras dérmicas en los casos que se usen como apósitos.

Referencias

Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., y Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.

Aresta, A., Calvano, C. D., Trapani, A., Cellamare, S., Zambonin, C. G., y De Giglio, E. (2013). Development and analytical characterization of vitamin (s)-loaded chitosan nanoparticles for potential food packaging applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), 1–12.

Asiamah, K.O. (2013). A review of nano food safety. *Frontiers of Agriculture and Food Technology*, 1(1), 008-012.

Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., y Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58–63.

Azevedo, M.A., Bourbon, A.I., Vicente, A.A., y Cerqueira, M. A. (2014). Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 141–146.

Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Lagarón, J. M., Paseiro-Losada, P., y Cruz, J. M. (2014). Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 310-318.

BSI (2009) 'DD CEN ISO/TS 27687: 2009'. Available from: <http://shop.bsigroup.com/ProductDetail/?pid=000000000030199918> [Accessed December 2018]

Caracciolo, P.C., Cortez Tornello, P.R., Buffa, F., Montini Ballarín, F., Cuadrado, T.R., y Abraham, G.A. (2011). Pequeñas fibras, grandes aplicaciones. *Ciencia hoy: Asociación Ciencia Hoy*, 21(121), 57-64.

- Caracciolo, P.C., Tornello, P.R., Ballarin, F.M., y Abraham, G.A. (2013). Development of electrospun nanofibers for biomedical applications: state of the art in Latin America. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 3(1), 39-60.
- Chandy, T., Wilson, R. F., Rao, G. H., y Das, G. S. (2002). Changes in cisplatin delivery due to surface-coated poly (lactic acid)–poly (ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Biomaterials Applications*, 16(4), 275-291.
- Douglas, K.L., y Tabrizian, M. (2005). Effect of experimental parameters on the formation of alginate–chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *Journal of Biomaterials Science*, 16(1), 43–56.
- Duque-Sánchez, L.M., Rodriguez, L., y López, M. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1), 10-27.
- Esmaeili, A., y Asgari, A. (2015). In vitro release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 283-290.
- Flores, F. P., y Kong, F. (2017). In vitro release kinetics of microencapsulated materials and the effect of the food matrix. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 237-259.
- Guterres S.S., Alves M.P., y Pohlmann A.R. (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights* 2, 147–157.
- Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2).
- Guzmán Chávez, A., y Toledo Patiño, A. (2009). Las nanotecnologías: un paradigma tecnológico emergente. *Dinamica y especialización en la innovación de las tecnologías. Razón y Palabra*, 14(68).
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., y Farokhzad, O.C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical Reviews* 116(4), 2602-2663.

Karim, K., Mandal, A., Biswas, N., Kazi, K. M., Mandal, A. S., Biswas, N., Guha, A., Chatterjee, S., Behera, M., y Kuotsu, K. (2010). Niosome: a future of targeted drug delivery systems. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(4), 374–380.

Karimi, M.A., Pourhakkak, P., Adabi, M., Firoozi, S., Adabi, M., y Naghibzadeh, M. (2015). Using an artificial neural network for the evaluation of the parameters controlling PVA/chitosan electrospun nanofibers diameter. *e-Polymers* 15(2), 127–138.

Kaul, S., Gulati, N., Verma, D., Mukherjee, S., y Nagaich, U. (2018). Role of nanotechnology in cosmeceuticals: A review of recent advances. *Journal of Pharmaceutics*. DOI: [10.1155/2018/3420204](https://doi.org/10.1155/2018/3420204)

Keawchaoon, L., y Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 163–171.

Li, Z., y Wang, C. (2013). Effects of working parameters on electrospinning. In *One-Dimensional Nanostructures* (pp. 15-28). Springer Berlin Heidelberg.

Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Tiliansky, M.E., Kalinina, N. O. (2014). Green nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(1):35-44.

Matalanis, A., Jones, O.G., y McClements, D.J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865-1880.

Meng, Z.X., Zheng, W., Li, L. y Zheng, Y.F. (2011). Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Materials Chemistry and Physics*, 125, 606–611.

Nagy, Z.K., Balogh, A., Démuth, B., Pataki, H., Vigh, T., Szabó, B., Molnár, K., Schmidt, B., Horák, P., Marosi, G., Verreck, G., Van Assche, I., y Brewster, M. E. (2015). High speed

electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 480(1), 137-142.

Ouahid Hessissen, A. (2016). Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología. Trabajo final de grado, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Pal, S.L., Jana, U., Manna, P.K., Mohanta, G.P., Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: an overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1, 228–234.

Park, B. (2013). Nanotechnology and the packaging of food and other fast-moving consumer goods. In *Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG)* (pp. 241-260).

Persano, L., Camposeo, A., Tekmen, C., y Pisignano, D. (2013). Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: a review. *Macromolecular Materials and Engineering* 298(5), 504-520.

Pinto, R.C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J, y Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2, 8–21.

Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., y Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation: I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8–21.

Rosales-Martínez, P., Cornejo-Mazón, M., Arroyo-Maya, I.J., y Hernández-Sánchez, H. (2018). Chitosan micro-and nanoparticles for vitamin encapsulation. Chap.19. En *Nanotechnology applications in the food industry*. 1st Edition V Ravishankar Rai, Jamuna A Bai. ISBN 9781498784832 CRC Press Taylor & Francis Group.

Soto Martínez, K.M., Rincón Aguirre, J.A., y Mendoza Díaz, S. O. (2017). Electroestirado. Producción de fibras con biopolímeros de interés en la industria de alimentos. En: *Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos*, 103-136.

Siegrist, M., Cousin, M.-E., Kastenholz, H., y Wick, A. (2007). Public acceptance of nanotechnology foods and food packaging: The influence of affect and trust. *Appetite*, 49, 459-466.

Singh, H. (2016). Nanotechnology applications in functional foods; opportunities and challenges. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(1), 1.

Srinivas, K. (2016). The current role of nanomaterials in cosmetics. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(5), 906–914.

Taniguchi, N. (1974) Proceedings of the International Conference on Prod. Eng. Tokyo. Part II, Japan Society of Precision Engineering.

Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., y Moustaid-Moussa, N. (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 363-376.

Woranuch, S. y Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96, 578-585.

Yan, E., Fan, S., i Li, X., Wang, C., Sun, Z., Ni, L., y Zhang, D. (2013). Electrospun polyvinyl alcohol/chitosan composite nanofibers involving Au nanoparticles and their in vitro release properties. *Materials Science and Engineering C* 33, 461–465.

Zhuang, X.P., Cheng, B.W., Kang, W.M. y Xu, X.L. (2010). Electrospun chitosan/gelatin nanofibers containing silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 82, 524–527.

Capítulo 1



Capítulo 1

1.1 Introducción

Desde el punto de vista químico, la estructura molecular de la quitina (Figura 1.1 a) consiste en unidades de 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). Este biopolímero es uno de los más abundantes en la naturaleza en términos de ocurrencia estática luego de la celulosa y primero por su tasa de regeneración en la biósfera, que se estima el doble de la celulosa (Dutta y col., 2002; Muzzareli y Muzarelli, 2005). La quitina forma parte del exoesqueleto de artrópodos, insectos, cefalópodos, incluyendo las conchas de crustáceos, camarones, gambas, langostas, cangrejos, así como de las paredes celulares de hongos y algas (Aunkham y col., 2018; Jayakumar y col., 2011).

El quitosano es un copolímero de 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucosamina y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosamina (Figura 1.1 b) que se obtiene por desacetilación de la quitina, dejando libre el grupo amino del carbono 2. Cuando la estructura no está desacetilada, el nitrógeno forma parte de la función amida. El quitosano contiene tres tipos de grupos funcionales reactivos: un grupo amino/acetamido y grupos hidroxilos primarios y secundarios en las posiciones C-2, C-3 y C-6. Los grupos amino libres se encuentran en las unidades desacetiladas y los grupos hidroxilos tanto en las unidades acetiladas como en las desacetiladas. El carácter catiónico y básico del polielectrolito, atribuido a la presencia de grupos amino en las unidades glucosamina, le confieren reactividad y un rasgo distintivo en comparación con los polisacáridos aniónicos (pectina, dextrano, alginato, carragenano, entre otros) que exhiben propiedades ácidas en solución acuosa.

Este biopolímero tiene la capacidad de unir grupos funcionales, proporcionando una gran versatilidad en el diseño de estructuras o compuestos novedosos (Silva-Castro y col., 2017). Los grupos amino pueden experimentar reacciones específicas de derivatización como la N-acilación, cuaternización, aminación reductiva y reacciones de Schiff entre algunas de las modificaciones por vía química (Kumar y col., 2011; Park y col., 2003). Asimismo, pueden darse modificaciones por reacciones inespecíficas en los hidroxilos particularmente en las posiciones del C-6 y C-3, siendo éstas generalmente

esterificaciones y eterificaciones (Berghoff, 2011). Estas modificaciones del polímero permiten la preparación de un amplio espectro de derivados con potenciales aplicaciones en diversas áreas. La disponibilidad de sitios reactivos permite la vinculación lateral y la formación de aldminas y ketiminas con aldehídos y cetonas.

El contenido y disponibilidad de grupos aminos es clave porque determinan las propiedades estructurales y fisicoquímicas del polímero, que a su vez influyen en reacciones que involucren fenómenos como la quelación, floculación, así como y su participación en funciones biológicas (Xia y col., 2011).

Debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades no-tóxicas, el quitosano es considerado un biopolímero (Ahsan y col., 2018; Aranaz y col., 2009; Khan y Tanaka 2018; Kean y Thanou, 2010). A partir de este biopolímero es posible obtener oligómeros de quitosano mediante un proceso de depolimerización aplicando condiciones de reacción relativamente suaves (Dash y col., 2011).

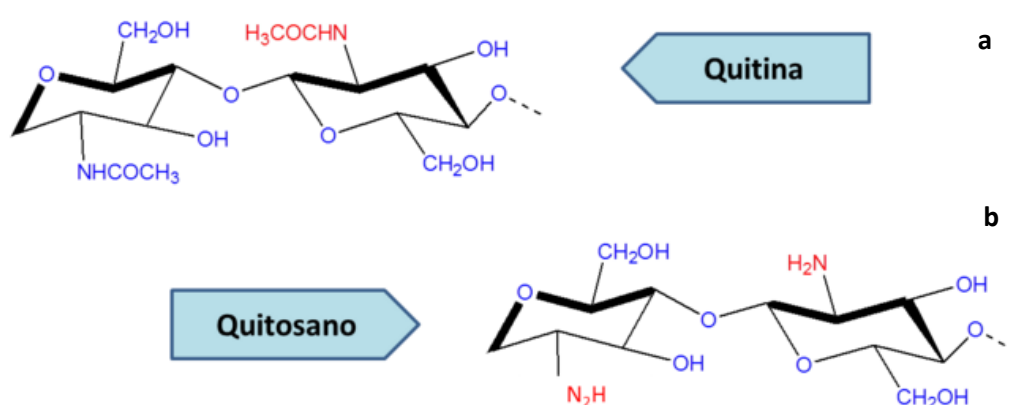


Figura 1.1 Estructura química de: **a)** quitina y **b)** quitosano. <https://steemit.com/stem-espanol/@viannis>

La composición y el tamaño de las cadenas del polímero son determinados tanto por la fuente de extracción del quitosano, como por las condiciones del método de obtención. Si bien el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son parámetros importantes que condicionan sus propiedades funcionales, la cristalinidad (Huang y col., 2018), el

contenido de agua y de cenizas (Gomaa y col., 2018) también son características fisicoquímicas a tener en cuenta para determinar las potenciales aplicaciones del polímero. Gomaa y col. (2018) extrajeron quitosano a partir de biomasa de *Aspergillus niger* obteniendo un polímero con un grado de desacetilación de 83% y un peso molecular de $2,7 \times 10^4$ Da, en tanto que Huang y col. (2018) obtuvieron quitosano de calamares previamente tratados por compresión con un grado de desacetilación similar al encontrado por Gomaa y col. (2018), pero con un mayor peso molecular ($7,8 \times 10^5$ Da).

La hidrólisis del grupo N-acetilo con la consecuente presencia de grupos aminos en su estructura genera un aumento en la capacidad hidrofílica del quitosano, el cual se torna soluble en soluciones ácidas (ácido acético, fórmico clorohídrico, entre otros). La solubilidad del polímero estará determinada principalmente por tres parámetros: el grado de desacetilación (GD), la distribución de los grupos acetilo y el grado de polimerización. El quitosano forma sales con ácidos y origina polielectrolitos a pH menores que 6,5. Cuando el pH aumenta por encima del pKa del polímero (6,3-6,5) la carga positiva de los grupos amino se pierde y por lo tanto, el quitosano precipita insolubilizándose (Huang y col., 2018; Pillai y col., 2009).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble capaz de formar películas, hidrogeles, andamios porosos, nanoestructuras fibrosas, micro y nanopartículas (Goycoolea y col., 2000).

El quitosano se ha utilizado ampliamente en la industria de alimentos y está aprobado como aditivo en Japón. Se comercializa en Europa, EUA y en otros países incluyéndolo en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso. Se ha evaluado en ensayos clínicos como potenciador de la penetración de fármacos por vía nasal (Illum y col., 2001) y como excipiente farmacéutico (Singla y Chawla, 2001).

En diferentes estudios se ha demostrado la actividad hipercolesterolémica e hipolipidémica del quitosano (Domard y Domard, 2002) así como las propiedades antimicrobiana, antiviral y antitumoral. A causa de estas excelentes características, el quitosano se ha empleado en diferentes áreas como en la biomedicina, cosmética, medicamentos, suturas quirúrgicas, vendas y esponjas biodegradables. Asimismo, este

polímero se ha utilizado en el diseño de matrices para la liberación controlada y sostenida de compuestos activos en forma de microesferas, microcápsulas, membranas y pastillas comprimidas (Aldana y col., 2012; Ali y Ahmed 2018; Nagpal y col., 2012; Peniche y col., 2003), así como en materiales ortopédicos y odontología. Otras propiedades biológicas han sido extensamente descritas en la literatura, tanto in vitro como en modelos animales; entre ellas cabe mencionar la mucoadhesividad, biocompatibilidad (VandeVord y col., 2002), inmunoestimulación (Borges y col., 2007; Zaharoff y col., 2007), capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales (Smith y col., 2004).

En el campo biomédico se han realizado desarrollos en base a lentes de contacto, adhesivo de tejidos. También se ha empleado el quitosano junto con la quitina en el tratamiento de heridas, úlceras y quemaduras, debido a su carácter hemostático y su efecto sobre la regeneración celular implicado en el proceso de cicatrización. Asimismo, debido a su afinidad celular y su biodegradabilidad, ha sido usado en la restauración y regeneración de tejidos, incluyendo su potencial aplicación como un material estructural en la ingeniería de tejidos (Singla y col., 2001; Zargar y col., 2015).

La actividad antimicrobiana inherente del quitosano frente a amplio espectro de bacterias (Bulwan y col., 2012; Doulabi y col., 2013; Fernández-Saiz y col., 2008) y hongos (Garrido-Assis y de Britto, 2011; Ávila-Sosa y col., 2012; Martínez-Camacho y col., 2010; Sebti y col., 2005) ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. En este sentido, las películas de quitosano son considerados sistemas prometedores para su uso en la conservación de alimentos (Yuan y col., 2016).

Las características de la materia prima de partida tales como el grado de polimerización y su grado de acetilación son estrechamente dependientes de los tratamientos empleados en su extracción. Por lo tanto, es posible obtener quitosano con diferentes propiedades, tanto desde el punto de vista químico como funcional, dependiendo de la fuente de obtención materia prima y de las condiciones de empleadas para su extracción.

La Figura 1.2 muestra el diagrama de flujo para la obtención de quitosano a partir de quitina. El proceso se inicia con la recepción y acondicionamiento de la materia prima para alcanzar el aislamiento y purificación de la quitina.

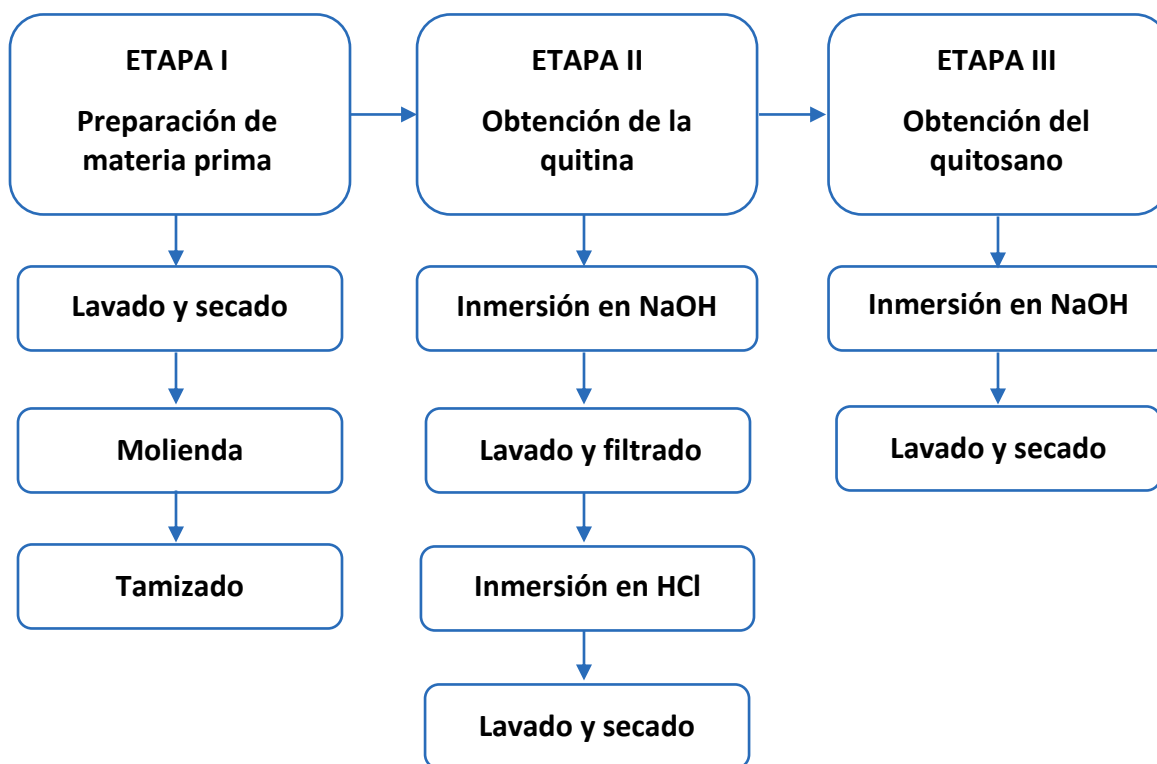


Figura 1.2. Diagrama de flujo del proceso de extracción de la quitina y posterior obtención y purificación de quitosano.

El aislamiento y purificación involucra una la extracción de proteínas (desproteínización), la eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización) por tratamiento ácido. Cabe señalar que el contenido mineral de los residuos de origen crustáceo conforma entre el 30 y el 55 % y está constituido principalmente por carbonato de calcio (CaCO_3) y fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en menor proporción. Además, opcionalmente al proceso de extracción se puede realizar la separación de pigmentos naturalmente presentes (decoloración) como las astaxantinas (Giraldo, 2013).

Teniendo en cuenta la naturaleza del quitosano y los diferentes métodos usados para su obtención existe una gran variabilidad en cuanto a las propiedades fisicoquímicas del polímero comercializado.

Teniendo en consideración los posibles usos del polímero los objetivos planteados para este capítulo fueron:

- Caracterizar un quitosano comercial obtenido de caparazones de crustáceos a través del estudio de su composición química y de sus principales propiedades fisicoquímicas.

1.2 Materiales

Se usó quitosano (Q) proveniente de caparazones de crustáceos (langosta, cangrejo y camarón) suministrado por Polymar Ciência e Nutrição (Fortaleza, Brasil). El producto se presenta bajo la forma de polvo. El ácido acético fue adquirido a Anedra (Buenos Aires, Argentina).

1.3 Metodología y resultados obtenidos

1.3.1 Determinación de impurezas, cenizas y contenido de nitrógeno

Para determinar las impurezas (sólidos insolubles) presentes en el polímero se solubilizó el quitosano en una solución de ácido acético al 1,5 % (v/v) bajo agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Luego de solubilizar el polímero, la solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min, para facilitar la separación del material insoluble. Este residuo fue secado en estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1$ hasta alcanzar peso constante. El contenido de impurezas promedio del lote de quitosano con el que se trabajó a lo largo de todo el trabajo de Tesis fue de $4,0\% \pm 0,2$.

El contenido de agua se cuantificó gravimétricamente colocando muestras de quitosano en una estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1$ hasta alcanzar peso constante. Los resultados se expresaron como g de agua cada 100 g de quitosano. Todas las medidas se realizaron al

menos por duplicado. Se obtuvo un contenido de humedad de $12,86\pm 0,04$, similar al informado por Hernández Cocolletzi y col. (2009). Los autores relacionaron estos resultados con el proceso de remoción de grupos acetilo luego de la desacetilación termoalcalina de la quitina aumentando la disponibilidad de grupos amino libres capaces de interactuar con las moléculas de agua.

La determinación del contenido de cenizas es indicativa de la eficiencia del proceso de desmineralización y purificación empleado por el fabricante. Para cuantificar el contenido de cenizas se siguió el método descrito por la AOAC (1999). Para ello se utilizaron cápsulas de porcelana previamente calcinadas en mufla. La muestra se carbonizó hasta la obtención de un residuo carbonoso, el cual se calcinó en una mufla a $500-550^{\circ}\text{C}$ hasta obtener cenizas blancas. El resultado se expresó como porcentaje de cenizas (g de cenizas por cada 100 g de polímero) obteniendo un valor de $2,44\pm 0,17$. Cabe señalar, que este resultado podría estar relacionado con la presencia de impurezas de tipo mineral, como el calcio, contenido en sales de CaCO_3 proveniente de los caparazones o incluso la presencia de contaminantes metálicos. El resultado depende, en gran medida, del origen, propiedades y condiciones de obtención y purificación del quitosano. Similares explicaciones fueron propuestas por Hernández Cocolletzi y col. (2009). Asimismo, los autores remarcaron que el mayor contenido de cenizas podría estar asociado a la concentración de NaOH utilizada en la etapa de desacetilación lo que facilitaría la retención de impurezas.

Para cuantificar el contenido de nitrógeno total en la muestra de quitosano se utilizó el método de Kjeldahl-Arnold-Gunnig de acuerdo con el protocolo propuesto por la AOAC (1999). Se pesaron aproximadamente 0,5 gramos de quitosano en polvo para luego proceder a la digestión en presencia de H_2SO_4 96% (p/p) Anedra (Buenos Aires, Argentina) de la muestra. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado. El contenido de nitrógeno total de las muestras de quitosano fue en promedio $6,4\% \pm 0,2$. Este valor es semejante al informado por Rahmaninia y col. (2018).

1.3.2 Determinación de peso molecular y grado de deacetilación

Los dos factores más importantes que determinan las propiedades fisicoquímicas, y por consiguiente los usos específicos del quitosano, son el grado de desacetilación (GD) y el peso molecular (PM). De acuerdo a las características estructurales del quitosano es posible encontrar una serie de polímeros con diferentes grados de desacetilación, el que es definido como el porcentaje de grupos amino primarios libres en el esqueleto del polímero.

El GD afecta su pKa intrínseco, conduciendo a un cambio en la solubilidad del quitosano en soluciones diluidas ácidas. Cuando el GD es menor que el 40 %, las cadenas de quitosano se tornan completamente insolubles en agua debido a los puentes de hidrógeno establecidos entre el alcohol, la amida y los grupos éter distribuidos sobre las unidades monoméricas a lo largo de la cadena del polímero y a la contribución de las interacciones hidrofóbicas, debido a la presencia de los grupos metilo de las funciones acetamida y a los -CH y -CH₂ de los anillos glucosídicos (Domard y Domard, 2002).

Cuando el DD está por encima del 40%, el polímero es soluble en soluciones ácidas diluidas. Este comportamiento está relacionado con el hecho de que la protonación de los grupos amino de los residuos de glucosamina contribuyen a la interrupción de las uniones puente de hidrógeno, la solvatación de los sitios catiónicos, y luego a la solubilización cuando el equilibrio de las interacciones disolvente/polímero y polímero/ polímero se vuelve favorable. Este límite está estrechamente relacionado con el valor del pKa intrínseco del quitosano, que se encuentra cercano a 6,5 (Domard y Domard, 2002). Así, cuanto más alto es el GD del quitosano, más alta es la cantidad de grupos amino libres -NH₂ que pueden protonarse (NH₃⁺) en medio ácido confiriéndole al polímero un carácter altamente reactivo.

La mayor parte de los polímeros son mezclas de macromoléculas de distintos tamaños, por lo que el peso molecular proporciona siempre un valor promedio. Por tanto, según el método experimental utilizado se definen distintos valores promedio del peso molecular: en número (M_n), en peso (M_w) o viscosimétrico (M_v). La relación entre los valores de M_w/M_n se conoce como polidispersidad.

Una de las técnicas más utilizadas para determinar el peso molecular es la **viscosimétrica**. Es un método fácil y rápido que permite conocer el peso molecular promedio viscosimétrico (M_v). Cuando el polímero es poco polidisperso, M_v corresponde aproximadamente a M_w (Ravi Kumar, 2000).

La viscosidad de un polímero en solución depende de la naturaleza del mismo, del disolvente, de la distribución de pesos moleculares, de la concentración y de la temperatura. Para cuantificar la relación viscosidad/peso molecular se requiere realizar una calibración con muestras de peso molecular conocido. En ausencia de patrones se utiliza la correlación existente para un polímero de naturaleza similar en el mismo solvente y temperatura.

El peso molecular de los polímeros está relacionado con la viscosidad intrínseca $[\eta]$ o índice de viscosidad límite, que define como la medida de la capacidad de una molécula de polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente en ausencia de interacciones intermoleculares, y se relaciona con el peso molecular mediante la ecuación propuesta por Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (Kasaai, 2007; Rinaudo, 2006).

$$\eta = K[M_v]^a \quad [1.1]$$

donde,

M_v es el peso molecular viscosimétrico promedio y los parámetros **K** y **a** , denominados constantes de Mark-Houwink, dependen de la naturaleza del polímero, del disolvente y de la temperatura. **K** y **a** son coeficientes calculados empíricamente válidos para cada sistema soluto-disolvente particular utilizando como referencia muestras de peso molecular conocido, a una temperatura específica. **K** es función de la polaridad del solvente y de las fuerzas intermoleculares entre el soluto y el disolvente mientras que **a** permite estimar la flexibilidad de la macromolécula y su conformación en solución. Este factor de expansión tiene en cuenta el cambio experimentados por la molécula de soluto en presencia del disolvente (Curvale y col., 2008). Estos parámetros pueden ser obtenidos a partir de bibliografía (Khan y col., 2000; Huang y col., 2018; Ravi Kumar 2000).

Mediante la ecuación de Hagen-Poiseuille para líquidos con movimiento en flujo laminar se puede relacionar el tiempo que tarda en pasar un fluido por un capilar con la viscosidad del mismo. Por lo tanto, la viscosidad de una solución puede definirse como el tiempo que tarda la disolución en pasar por un capilar fino entre dos marcas consecutivas por efecto de la gravedad.

$$Q = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 \eta l} \quad [1.2]$$

donde,

Q es el caudal del fluido expresado en $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$, ΔP es la diferencia de presión que mantiene el flujo (dynas cm^{-2}), r es el radio del capilar en cm, η es la viscosidad de la solución ($\text{kg cm}^{-1} \text{s}^{-1}$) y l es la longitud del capilar en cm. Teniendo en cuenta que Q también puede expresarse como V/t, donde V representa el volumen del fluido desplazado en cm^3 y t el tiempo de escurrimiento en s, es posible encontrar una expresión que relacione la viscosidad con el tiempo de escurrimiento:

$$\eta = \frac{\pi \Delta P r^4 t}{8 V l} \quad [1.3]$$

Para considerar el efecto de la concentración (c) en la viscosidad, se utilizan los parámetros conocidos como viscosidad reducida (η_{red}) y viscosidad inherente (η_{inh}). Estas ecuaciones son válidas cuando las soluciones de polímeros son diluidas. El procedimiento se basa en determinar la viscosidad relativa por comparación con la del disolvente puro para diferentes concentraciones de polímero y representar los datos mediante las siguientes ecuaciones:

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{c} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \frac{1}{c} = \frac{(t - t_0)}{t_0} \frac{1}{c} \quad [1.4]$$

$$\eta_{\text{inh}} = \frac{\ln(\eta_r)}{c} = \frac{1}{c} \ln\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right) = \frac{1}{c} \ln\left(\frac{t}{t_0}\right) \quad [1.5]$$

donde,

η y η_0 son, respectivamente, las viscosidades de la disolución y la del disolvente puro, t es el tiempo medido entre dos marcas sucesivas en el capilar y t_0 el tiempo correspondiente al disolvente puro medido en el mismo capilar

La relación entre la viscosidad y la concentración fue demostrada empíricamente por Huggins (1942) y Kramer (1938) y puede ser estimada mediante las siguientes expresiones:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \approx [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad [1.6]$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_r)}{c} \approx [\eta] + k_K [\eta]^2 c \quad [1.7]$$

donde,

k_H y k_K son las constantes de Huggins y Kramer, respectivamente.

Para soluciones diluidas, las curvas se aproximan a dos rectas que, extrapoladas a concentración nula, coinciden en el parámetro $[\eta]$. La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, razón por la que su determinación se realiza extrapolando la viscosidad reducida (η_{red}) y la viscosidad inherente (η_{inh}).

Este parámetro conocido como viscosidad intrínseca, expresada como ml g^{-1} , es una medida del volumen hidrodinámico que ocupan las macromoléculas en solución y por tanto refleja una relación con su tamaño y está directamente relacionado con el peso molecular del polímero en disolución (Ec. 1.1).

Las medidas se efectuaron en un viscosímetro capilar Cannon-Ubbelohde tipo semi-micro (modelo 150) termostatzado a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ en un baño de agua. Las muestras de quitosano fueron solubilizadas utilizando como solvente una mezcla de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M (Ravi Kumar, 2000), obteniéndose concentraciones en el rango comprendido entre $1,38 \times 10^{-3}$ y $3 \times 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$.

En la Figura 1.3 se muestran las viscosidades inherentes y reducidas en función de la concentración de polímero obteniéndose ajustes satisfactorios.

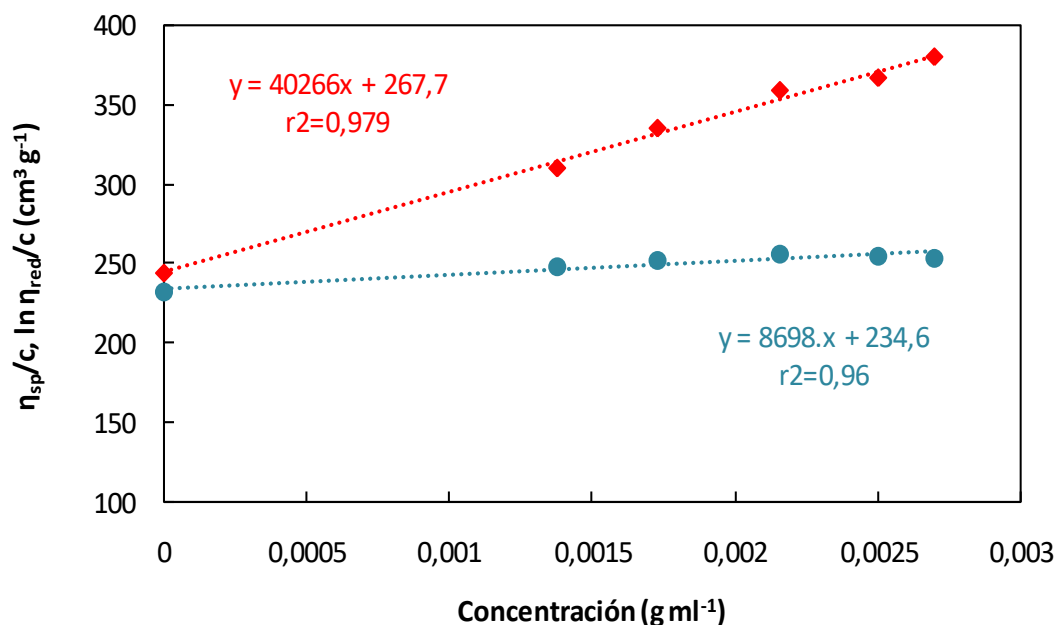


Figura 1.3. Determinación gráfica de la viscosidad intrínseca del polímero.

El peso molecular resultante fue $3,15 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, similar al informado por Huang y col. (2018) para quitosano proveniente de calamar.

1.3.3 Grado de desacetilación por potenciometría

El grado de desacetilación representa la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades en el biopolímero y se puede considerar como una medida de la pureza del biomaterial. Existen una gran cantidad de estudios en la literatura donde ha quedado demostrada la influencia del grado de desacetilación en las propiedades físico-químicas y en el desempeño del quitosano en diversas aplicaciones.

La estimación del GD del quitosano se ha realizado por diferentes métodos. Entre estos, podemos destacar la espectroscopia de infrarrojo la cual se desarrollará en el apartado 1.2.4 (Abdel-Rahman y col., 2015; Brugnerotto y col., 2001; Kumirska y col., 2010), la espectroscopia de UV (Kumirska y col., 2010; Muzzarelli y Rocchetti, 1985), la

espectroscopia de RMN (Duarte y col., 2001; Kumirska y col., 2010), la conductimetría (Raymond y col., 1993) y recientemente espectroscopía Raman (Zajac y col., 2015).

A pesar de la diversidad de métodos informados para la determinación del contenido de grupos amino libres, se seleccionó la titulación potenciométrica por tratarse de un método rápido y de bajo costo, que requiere de equipamiento y reactivos disponibles en el laboratorio (Abdou y col., 2008). La determinación del contenido de grupos amino en el quitosano se realizó mediante titulación potenciométrica ácido-base, método propuesto por Broussignac (1968) el cual consiste en medir las variaciones de los valores de pH al titular una solución de quitosano.

Previo a determinación, 0,5 g de quitosano se disolvieron en 20 ml de HCl 0,3 M y se tituló con una solución de NaOH 0,087 M valorada con biftalato de potasio utilizado como patrón primario. La titulación se llevó a cabo registrando el pH de la solución luego del agregado de distintos volúmenes de base, en forma lenta y con agitación continua para homogenizar la solución y evitar errores debidos a la posible floculación del biopolímero. El punto final de la titulación se determinó a través del método de la derivada primera, obtenida a partir de la curva de titulación. La potencimetría es un método útil siempre que el material a estudiar sea completamente soluble, ya que permite determinar el contenido de grupos aminos libres y en consecuencia el GD. De acuerdo a Hidalgo y col. (2009), la técnica tiene la ventaja de que cuantifica los grupos aminos protonados directamente, por lo que no existe el problema de la no accesibilidad de los grupos aminos durante la etapa de protonación, como resultado de la formación de la sal.

Las Figuras 1.4 a y b muestran la curva de titulación potenciométrica y la derivada primera de la muestra de quitosano analizadas.

Se observó que hacia al final de la titulación, a un pH básico (superior a 9), el quitosano floculaba, debido a que los grupos amino se encontraban desprotonados y por lo tanto el polímero se tornó insoluble en este medio.

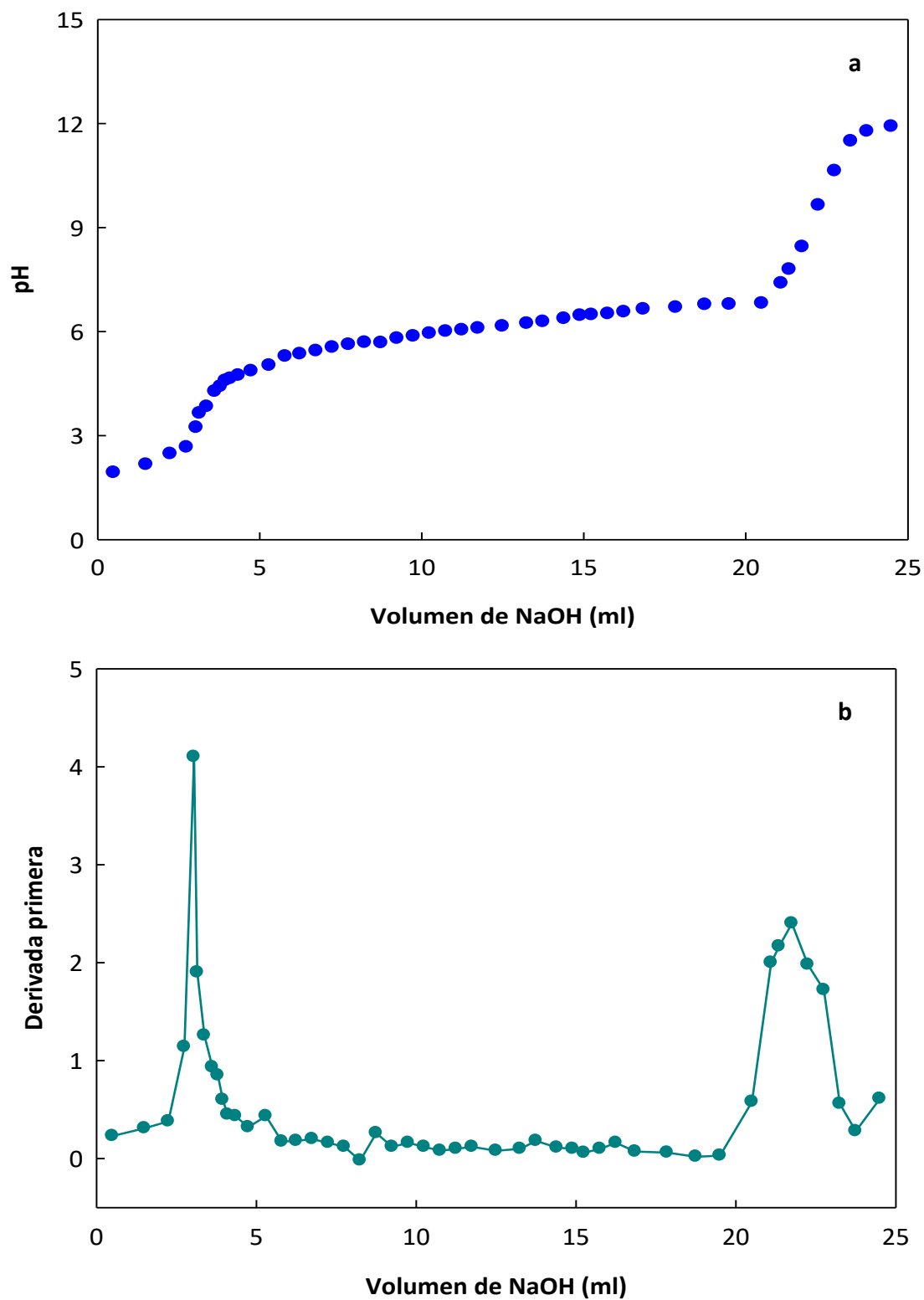


Figura 1.4. a) Curva de titulación potenciométrica; **b)** derivada primera proveniente de los datos de la curva de titulación. Los máximos corresponden a los puntos de inflexión

La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano, permitiendo calcular el grado de desacetilación (GD). La concentración de estos grupos se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%NH_2 = \frac{16,1(y-x)f}{w} \quad [1.9]$$

Donde, y es el punto de inflexión mayor, x corresponde al punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes en ml, f es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso de la muestra (expresado en g) y 16,1 es el peso equivalente del quitosano (expresado en g/equivalente). Este valor está relacionado al peso del grupo amino ($-NH_2$) (Abdou y col., 2008).

El valor obtenido para el quitosano utilizado en este trabajo de tesis fue de $57\% \pm 4$. Este grado de desacetilación bajo podría deberse al elevado contenido de impurezas presentes en la muestra (4%), por lo que se estaría subestimando el valor real correspondiente al GD. Heidari y col. (2018) extrajeron quitosano mediante hidrólisis en un medio fuertemente alcalino (convencional) a partir de camarones, obteniendo diferentes valores según el número de tratamientos con NaOH. Los autores, obtuvieron un GD de 50% después de realizar sólo una etapa de hidrólisis alcalina bajo condiciones controladas

1.3.4 ATR-FTIR

La espectroscopia de infrarrojo (IR) con transformada de Fourier es una de las técnicas analíticas más importantes y utilizadas debido a que puede emplearse para establecer la identidad de un compuesto (Kumirska y col., 2010). Cada grupo funcional tiene un modo de absorción característico que se presenta en el espectro como un pico o banda y aporta información acerca del tipo de uniones que se establecen cuando se mezclan con otras sustancias. El método se basa en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja. Durante la excitación es necesaria una variación del momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que

puede asociarse a vibraciones de tensión (simétricas o asimétricas) o de flexión (Figura 1.5).

Una pequeña muestra se coloca en una celda, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido en un rango de número de onda comprendido entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} . La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida a cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra.

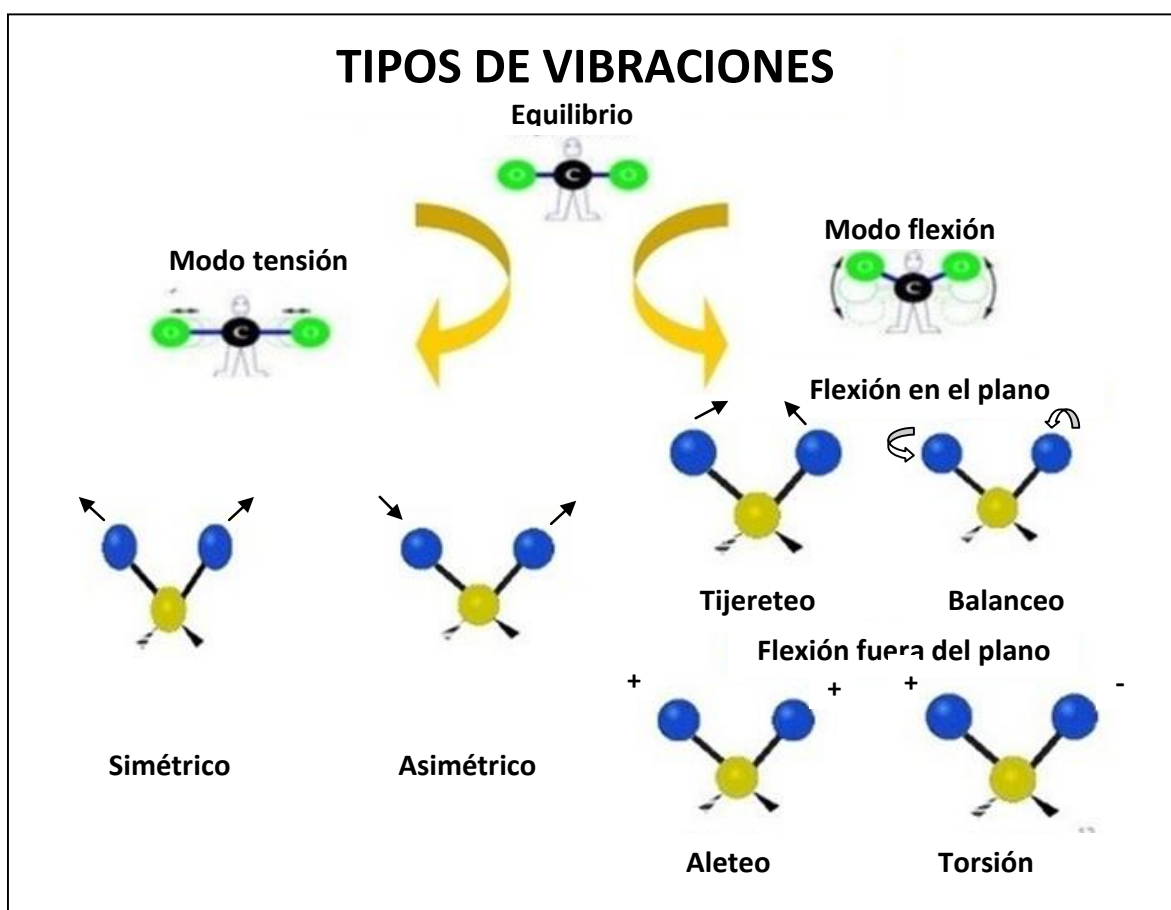


Figura 1.5. Clasificación de los tipos de vibraciones moleculares: de tensión, de flexión.
<https://socratic.org/questions/what-are-the-differences-between-stretching-vibration-and-bending-vibrations>

En la Figura 1.6 se presenta el espectro ATR-FTIR del quitosano en polvo, a partir del cual se observaron las siguientes bandas de absorción: a 3200 cm^{-1} se identificaron los picos asociados al modo vibracional de estiramiento del grupo -OH y -NH presentes en el quitosano, a 2880 cm^{-1} se detectó la banda asociada a la absorción producida por el estiramiento del grupo CH_2 , en tanto que las bandas a 1645 y a 1562 cm^{-1} se asignaron a los modos vibracionales de los grupos amida I y amida II, respectivamente. Cabe señalar que estas bandas son de vital importancia para corroborar la existencia de interacciones entre el quitosano con otros polímeros, o en presencia de agentes entrecruzantes o agentes activos ensamblados a un sistema (Lamarra y col., 2016; Yoksan y col., 2010).

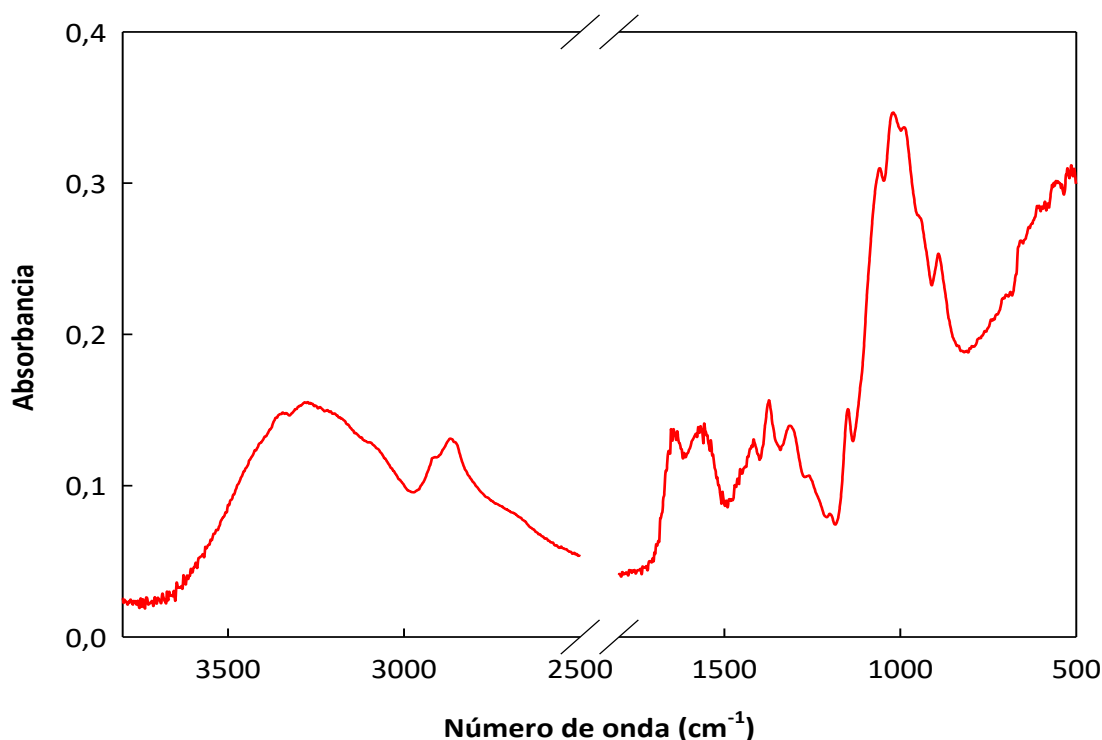


Figura 1.6. Espectro de absorción ATR-FTIR de quitosano en polvo.

Según Abdel-Rahman y col. (2015) el grado de desacetilación se puede calcular a través de la siguiente ecuación:

$$GD\% = \left(100 - \left(\frac{A_{1645}}{A_{3340}}\right) \times \frac{100}{1,33}\right) \quad [1.10]$$

En donde GD% es el grado de desacetilación, A_{1645} y A_{3340} son las absorbancias de las vibraciones pertenecientes a la amida I, respectivamente, en tanto que el factor 1,33 de la relación A_{1645}/A_{3340} se corresponde con un quitosano completamente desacetilado.

Utilizando esta ecuación el grado de desacetilación estimado fue del 67,5%. Este resultado fue similar al informado por Abdel-Rahman y col. (2015) y Hernández Cocolletzi y col. (2009) mediante medidas de ATR-FTIR obteniendo un GD del 65 %.

1.3.5 Análisis térmico a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. El método de DSC se ha revelado como una técnica importante en el campo de la Ciencia de Materiales debido a su elevado grado de sensibilidad y a su rápida velocidad de análisis. Por otra parte, es bien sabido que el conocimiento de la estabilidad térmica de un material, así como la completa caracterización de sus transiciones, es de interés primordial en los materiales con potenciales aplicaciones en el área de envases.

En los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes son la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_p). La medición por DSC da como resultado una curva del flujo de calor por unidad de masa en función de la temperatura. El calor total involucrado en el proceso, asociado al área bajo la curva, es proporcional al cambio de entalpía asociado (ΔH).

Los cambios entálpicos son registrados como eventos endotérmicos o exotérmicos, según el proceso que sufra la muestra. Otra transición que puede ser observada por DSC es la transición vítrea, es decir el paso del material amorfo vítreo a amorfo gomoso, o viceversa. La transición vítrea involucra un intervalo de temperaturas y el valor medio de la transición depende de las condiciones experimentales a las que se realiza su determinación sobre el material ensayado, por lo que se la denomina relajación o

transición cinética. Esto es debido al hecho que al calentar o enfriar su capacidad calorífica, C_p , aumenta o disminuye en el intervalo de temperaturas en que tiene lugar la transición. La fusión se manifiesta como un pico endotérmico.

Una forma general de proceder consiste en realizar, después del primer calentamiento del polímero en estudio, un enfriamiento, seguido de un segundo calentamiento, en las mismas condiciones experimentales que el primer calentamiento. La calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC), a diferencia de los analizadores térmicos convencionales, utiliza dos velocidades de calentamiento simultáneas, una velocidad de calentamiento lineal que brinda información similar al DSC estándar, y una velocidad de calentamiento modulada o sinusoidal que permite medir simultáneamente la capacidad calorífica de la muestra y diferenciar entre los eventos reversibles (dependientes de la capacidad calorífica) e irreversibles (dependientes del tiempo y la temperatura) que experimenta la muestra.

Las muestras se analizaron en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, USA, Figura 1.7). Se utilizaron patrones de indio y zafiro para la calibración del equipo. Para el ensayo, muestras en polvo de quitina y quitosano (4-6mg) se colocaron en cápsulas de aluminio, las que se cerraron herméticamente. Como referencia se empleó una cápsula vacía. Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el Universal Analysis V1.7F software (TA Instruments).

Los análisis de DSC se realizaron a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ para la modulación de la señal el período utilizado fue de 60 s con una amplitud de $0,5^{\circ}\text{C}$. El primer barrido se realizó en un intervalo de temperaturas de -80 a 200°C . Luego de que el primer barrido fue completado, se procedió al enfriamiento de la muestra hasta alcanzar una temperatura de 100°C donde se programó una isoterma durante 5 minutos para estabilizar el sistema (Rivero y col., 2016).

Posteriormente se registró una segunda corrida en el rango de temperaturas de -100°C hasta 350°C con el objeto de alcanzar la temperatura de descomposición del polímero.

En la primera corrida, la temperatura máxima alcanzada de 200°C fue seleccionada para limitar la posible degradación del polímero. La energía absorbida durante el primer

proceso corresponde a la energía requerida para vaporizar el agua que se encuentra fuertemente asociada al quitosano. Por lo tanto, las variaciones en cuanto a la posición del pico endotérmico reflejan diferencias en la capacidad de absorción de humedad asociado a la interacción polímero-agua (Rivero y col., 2016).

La Figura 1.7 muestra que el quitosano posee un evento endotérmico cercano a 139°C, en tanto que esta transición también se detectó en quitina (Sigma-Aldrich, USA) proveniente de camarones a 134°C. Ambas transiciones endotérmicas están asociadas a la remoción de agua retenida por el polímero. La entalpía asociada a este proceso fue de 262 Jg⁻¹ para el quitosano y 214 Jg⁻¹ para la quitina.

Rivero (2012), trabajando con quitosano purificado por Sigma-Aldrich con un GD del 75% informó valores de temperatura de pico de 144°C y una entalpía de fusión de 195 Jg⁻¹. Según Kittur y col. (2002) los polisacáridos presentan una fuerte afinidad por las moléculas de agua. Los autores indicaron que la afinidad por las moléculas de agua depende de la cantidad de sitios disponibles para interactuar. En el caso de la quitina la disponibilidad de grupos oxhidrilos capaces de interactuar con el agua es menor, en tanto que la remoción de los grupos acetamida luego del proceso de desacetilación genera una mayor cantidad de sitios hidrofílicos, lo que explicaría la mayor entalpía obtenida para el quitosano.

Por otra parte, los termogramas correspondientes al flujo de calor reversible pusieron en evidencia la temperatura de transición vítrea (T_g) del quitosano. Los eventos térmicos analizados por MDSC confirmaron la performance de la técnica para discriminar la relajación endotérmica asociada de la transición vítrea de quitosano del evento endotérmico atribuido a la remoción de agua. Dhawade y Jagtap (2012), informaron una T_g de 61°C para quitosano con un GD de 85% y un peso molecular aproximado de $7,1 \times 10^5$ g mol⁻¹ mediante análisis térmico por MDSC.

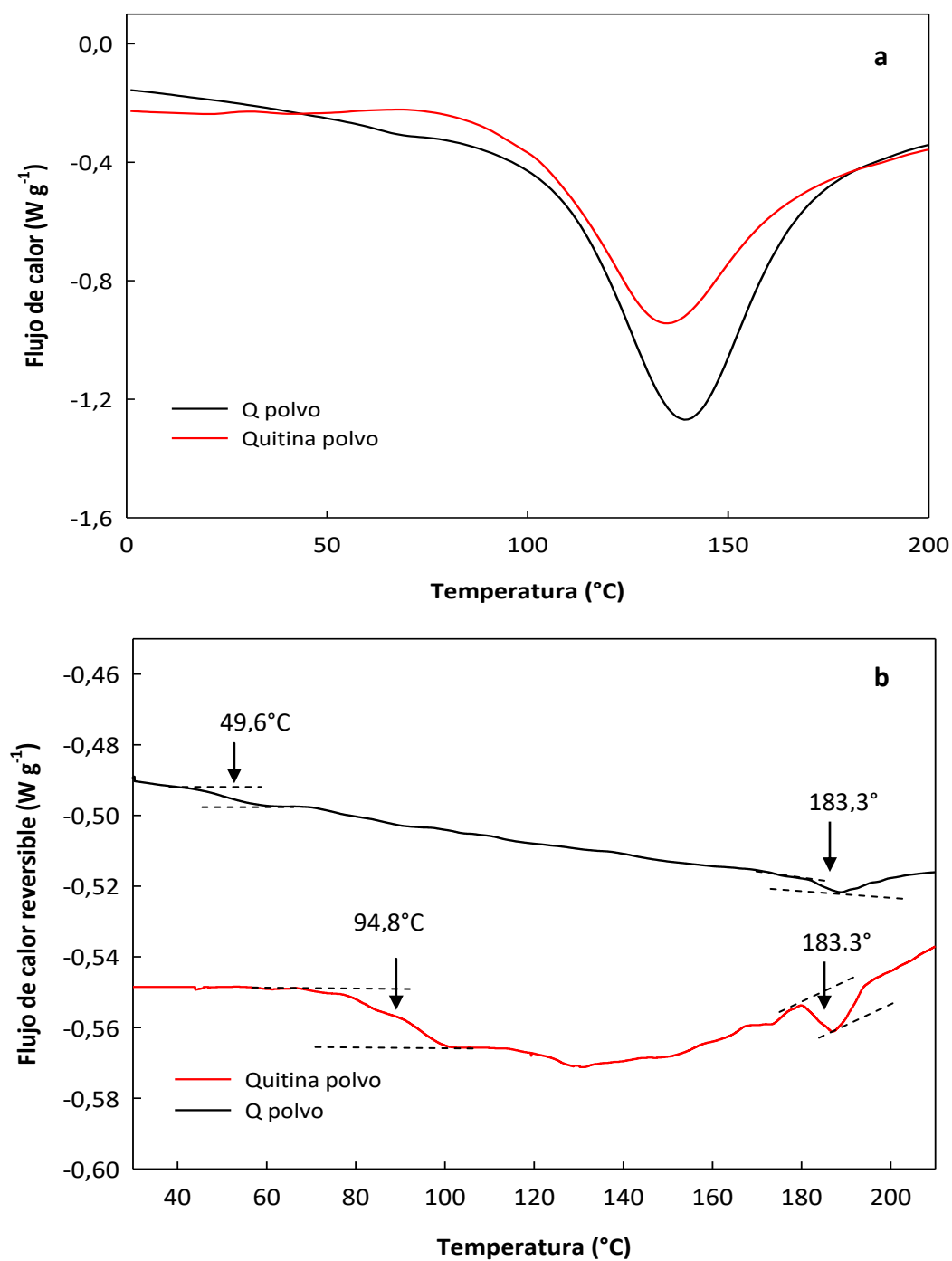


Figura 1.7. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido modulada de quitina y quitosano en polvo mostrando: **a)** flujo de calor y **b)** flujo de calor reversible.

La degradación térmica de polímeros ha sido uno de los estudios de mayor auge en comparación con los distintos métodos de análisis térmico. Este estudio degradativo se ha aplicado a polímeros naturales y sintéticos, del cual se obtiene información acerca del mecanismo de degradación, predicción de la estabilidad térmica y cinética de degradación de un material bajo una atmósfera inerte y oxidativa (Rodríguez y col., 2010). La técnica de análisis termogravimétrico (TGA) mide la cantidad y rapidez del cambio en peso de una muestra en función de la temperatura y/o del tiempo en una atmósfera controlada. De manera general, permite realizar medidas para determinar la composición de los materiales y predecir su estabilidad alcanzando temperaturas en el rango de 100°C hasta 1500°C. Esta técnica puede, por tanto, caracterizar materiales que presentan pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación.

El equipo consiste en una microbalanza inserta en un horno, controlado por un microprocesador (PC), que se programa con la rampa de calentamiento adecuada hasta la temperatura final del análisis; generalmente se usa 10 °Cmin⁻¹. La muestra se coloca sobre un platillo dentro del crisol de alúmina, se registra esta masa como la inicial y se procede al calentamiento. A medida que procede el análisis se registra el cambio de masa. Sobre el registro gráfico se analiza la pérdida de masa y se calcula la variación porcentual de la misma. En el análisis térmico diferencial (DTA) se miden los cambios de temperatura de una sustancia o muestra con respecto a una temperatura de referencia, también mediante un programa de temperatura controlada y en una atmósfera de gas definida. Esta información es registrada simultáneamente con la de variación de masa en función de la temperatura, y permite identificar la diferencia de entalpía asociada a los procesos de descomposición térmica. Las transiciones o reacciones con cambios de entalpía endotérmica o exotérmica son causadas por transiciones de fase, modificaciones en la estructura cristalina, procesos de deshidratación, formación de compuestos, descomposición, oxidación, y reducción, liberación de hidrógeno entre otros. Generalmente, las transiciones de fase, deshidratación, reducción y algunas reacciones de descomposición producen efectos endotérmicos, mientras que la cristalización, oxidación y otras reacciones de descomposición producen efectos exotérmicos.

Se utilizó un equipo Shimadzu DTG-60 (Japón), empleando alúmina como referencia en cápsulas de aluminio bajo atmósfera de nitrógeno (caudal 30 ml min⁻¹) para prevenir cualquier degradación termo-oxidativa. El calentamiento se realizó a 10°C min⁻¹ desde temperatura ambiente hasta 600°C.

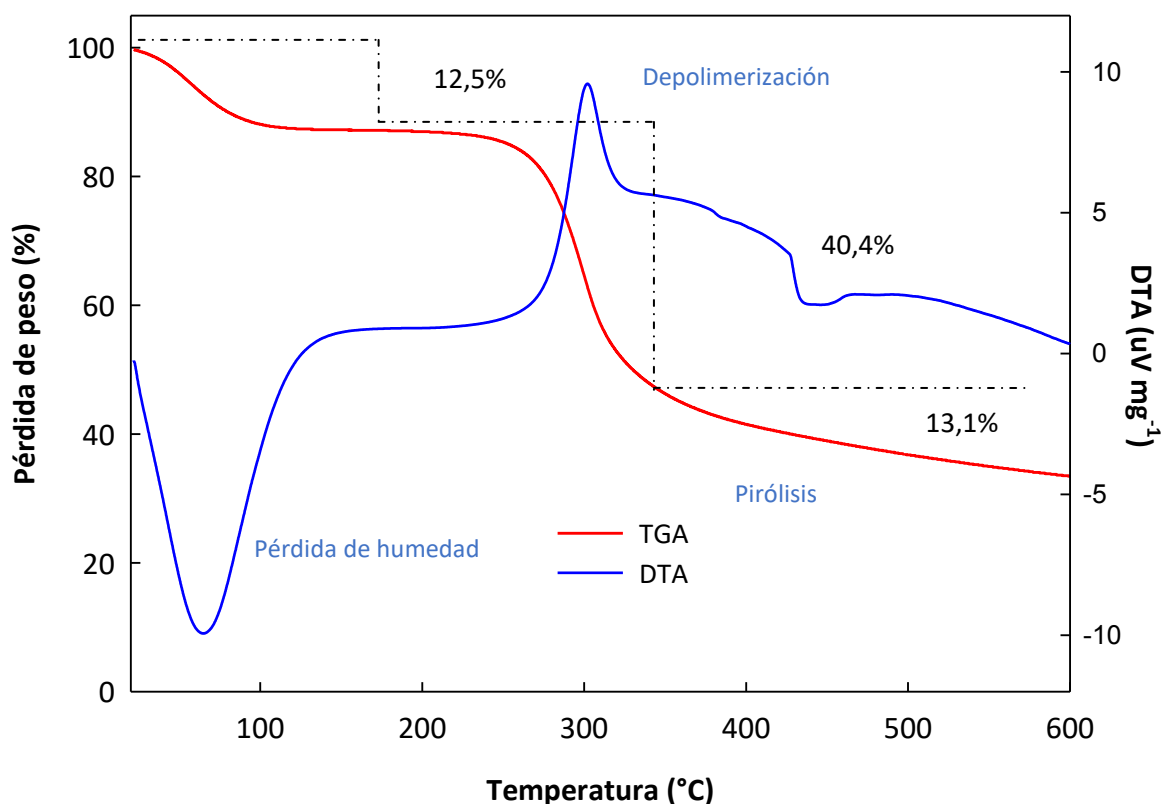


Figura 1.8. Termograma obtenido por TGA de quitosano en polvo.

La Figura 1.8 muestra el termograma de Q obtenido por TGA. En general, la disminución inicial de peso registrada correspondiente a la primera etapa comprendida entre 25 y-150°C estuvo asociada a la pérdida de componentes de bajo peso molecular, principalmente agua unida y adsorbida en la estructura (Dhawade y Jagtap, 2012).

El porcentaje de pérdida correspondiente a la segunda etapa comprendida entre 250-330°C se debieron a procesos complejos de depolimerización de las cadenas principales del quitosano (ruptura de los enlaces C-O-C) como la deshidratación de los anillos del

polisacárido, y a la descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas del quitosano (Abdel-Rahman y col., 2015; Dhawade y Jagtap, 2012; Neto y col., 2005). La temperatura a la cual comienza la descomposición se registró a 320 °C.

El tercer evento se relaciona con la pirolisis, el cual se da por la descomposición de la materia orgánica. Similares resultados fueron informados por Bello y col. (2017).

1.3.6 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica que permite la caracterización e identificación de materiales proveyendo información sobre la estructura y arreglo atómico de un espécimen. Proporciona, además, detalles sobre la presencia de imperfecciones o defectos, tamaño de partícula y espaciado interatómico.

Los materiales sólidos pueden ser cristalinos, semicristalinos o amorfos. Los cristalinos presentan un ordenamiento periódico de sus átomos, iones o moléculas.

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética cuya longitud de onda oscila entre 0,02 Å y 100 Å, siendo emitidos por los átomos debido a profundas perturbaciones en sus estructuras electrónicas. Cuando un haz de rayos X alcanza la superficie del compuesto a cualquier ángulo, una porción es dispersada por la capa de átomos de la superficie. La porción no dispersada penetra a la segunda capa de átomos y así sucesivamente. El efecto acumulativo de esta dispersión desde los centros regularmente espaciados del cristal es la dispersión del haz. El fundamento del método de DRX considera que la distancia entre los átomos, iones o moléculas empaquetados de forma regular en un cristal es del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de los rayos X, por lo que de acuerdo con las leyes de la óptica, estos cristales pueden producir fenómenos de difracción (Figura 1.9). W.L. Bragg (1913) determinó la ecuación que permite establecer la relación existente entre la longitud de onda de los rayos X y los espacios interplanares de los cristales.

La ley que describe la difracción de rayos X en término de reflexiones provenientes de los planos de un cristal se conoce como ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad [1.11]$$

donde,

λ es la longitud de onda del haz irradiado, d el espaciado entre planos atómicos y θ el ángulo entre el haz difractado o incidente y el plano cristalográfico.

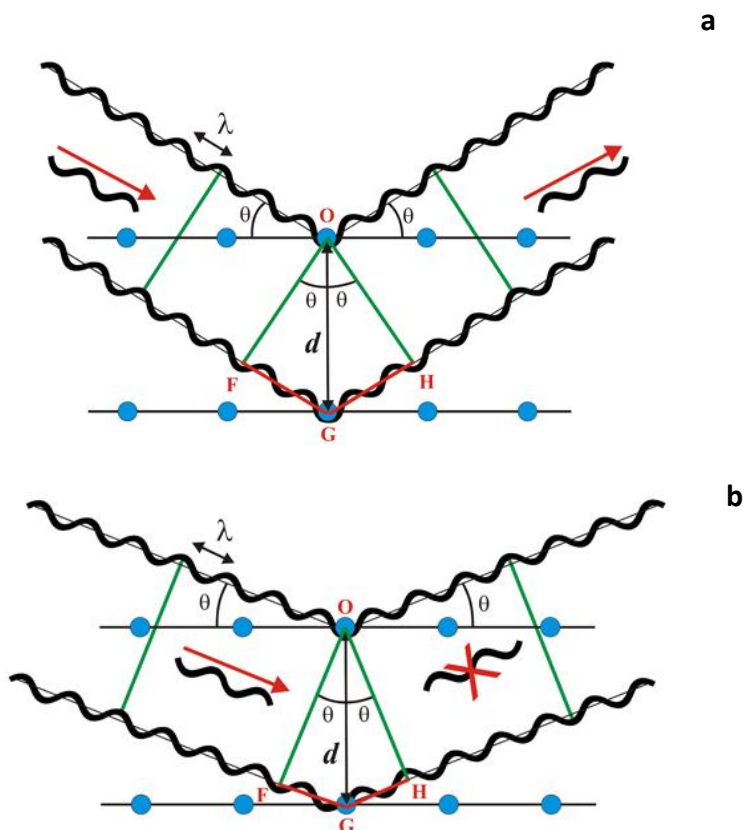


Figura 1.9. Esquema representativo de la ley de Bragg: **a)** en fase, **b)** en oposición de fase http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05_5.html

Representando la intensidad de radiación que llega al detector en función del ángulo θ aparecerá un pico cuando se cumpla la condición de Bragg (Ec. 1.11). Su presentación se denomina espectro de difracción o difractograma. Toda sustancia cristalina dispersa rayos X con su propio patrón de difracción, produciendo una “huella” de su estructura atómica y molecular. La difracción de rayos X presenta una característica única con la cual los

componentes se identifican como compuestos específicos a partir de sus diagramas de difracción.

La quitina, al igual que la celulosa, se encuentra en la naturaleza formando una matriz sólida hidratada compuesta por regiones amorfas donde se encuentran embebidas zonas cristalinas organizadas en forma de fibras fuertes. Estas fibras brindan soporte al exoesqueleto de los crustáceos y los insectos, al igual que a las paredes celulares de los hongos. En las fibras las cadenas de quitina se encuentran empaquetadas y asociadas lateralmente mediante múltiples enlaces de hidrógeno.

Análisis de difracción por rayos X han identificado tres formas polimórficas de quitina en la naturaleza, denominadas alfa (α), beta (β) y gamma (γ) quitina. Las mismas difieren no sólo por su arreglo en la región cristalina (empaquetamiento, disposición u ordenamiento y en las polaridades de las cadenas adyacentes dentro de la celda cristalina) sino también en su origen biológico (Zhang y col., 2005). Sus disposiciones se muestran en la Figura 1.10.

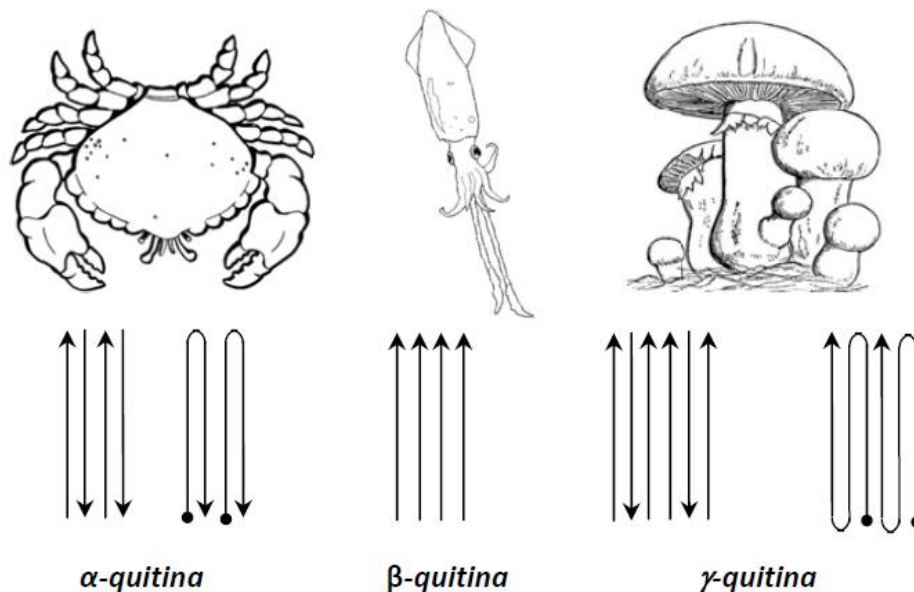


Figura 1.10. Formas polimórficas de la quitina y ejemplos biológicos de cada uno de ellos. Las “flechas” indican la disposición de las cadenas poliméricas. Adaptado de Berghoff (2011).

Varios estudios han sugerido que el alomorfo γ -quitina que presenta una disposición de dos cadenas paralelas en un sentido y la siguiente en sentido opuesto podría ser una versión distorsionada de la α o la β en vez de una tercera forma polimórfica (Figura 1.10) (Aranaz y col., 2009). La forma α es la más estudiada y estable, y se encuentra en los exoesqueletos de los artrópodos, en los hongos, y en los crustáceos específicamente en los caparazones de camarones y cangrejos. Presenta una disposición antiparalela de las cadenas poliméricas, las cuales se estabilizan por fuertes interacciones puentes de hidrógeno intercatenarios e intracatenarios. La forma β es casi exclusiva de la quitina proveniente de la pluma del calamar, de algunas diatomeas y de ciertas especies de las profundidades marinas, exhibe un ordenamiento paralelo y más abierto de las cadenas, que se caracteriza por interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno, más débiles (Figura 1.10). Ambas formas se pueden diferenciar mediante el análisis de sus difractogramas (Campana-Filho y col., 2007).

Los patrones de difracción de rayos X del quitosano se obtuvieron usando un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (Holanda), utilizando la línea Cu K α (1.542 Å), con una diferencia de potencial de 40 kV y una densidad de corriente de 30mA. Las muestras se registraron entre 4-60° (2 θ).

El patrón de difracción del quitosano exhibió los siguientes picos de difracción 2 θ = 9,3, 19,6, 25,5, 28,5, 34,6 y 38,6°, presentando un espectro característico de crustáceos (Figura 1.11). Las posiciones de los picos corresponden a las distancias interplanares 9,5, 4,6, 3,8, 3,4, 2,3Å, respectivamente (Abdel-Raham y col., 2015).

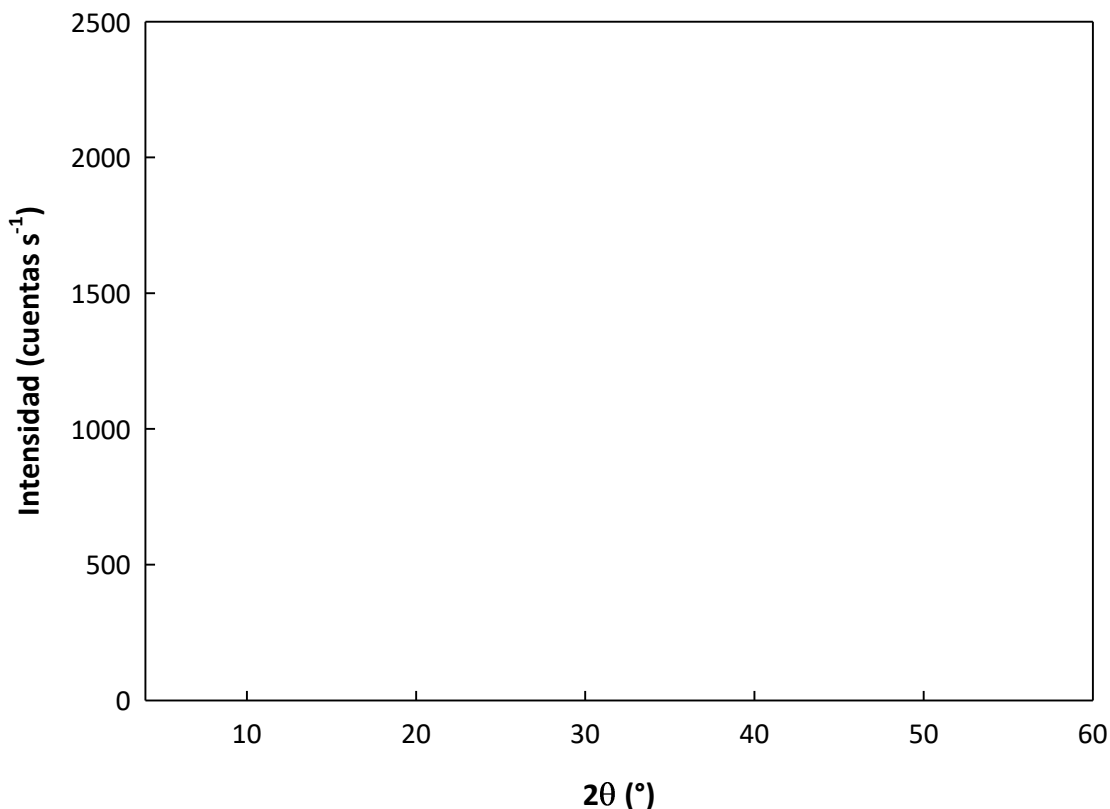


Figura 1.11. Espectro de difracción de rayos X de la muestra de quitosano en polvo.

En resumen, quitosano proveniente de crustáceos se caracterizó mediante diferentes herramientas analíticas como ATR-FTIR, MDSC, TGA, DRX, titulación ácido-base. Los resultados obtenidos se encuentran en el rango de los valores informados en bibliografía. Se trata de un material de origen natural, subproducto de la industria pesquera proveniente de distintos crustáceos y diferentes partes de los exoesqueletos donde no hay discriminación de especie, edad y etapa de desarrollo, con la variabilidad insoslayable que caracteriza este tipo de biomasa.

El método de obtención del polímero utilizado por el fabricante así como a variabilidad intrínseca de la materia prima, quitina, explicaría la heterogeneidad existente entre los quitosanos disponibles a escala comercial.

Referencias

Abdel-Rahman, R. M., Hrdina, R., Abdel-Mohsen, A. M., Fouda, M. M., Soliman, A. Y., Mohamed, F. K., Moshin, K. y Pinto, T. D. (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107-120.

Abdou, E. S., Nagy, K. S., y Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367.

Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A., y Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 97-109.

Aldana, A. A., González, A., Strumia, M. C., y Martinelli, M. (2012). Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics*, 134(1), 317-324.

Ali, A., y Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 273-286.

AOAC. (1999). Official methods of analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., y Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.

Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M. T. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Cruz, A. R. N., y López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 66-72.

Bello, C., José, L., Jacinto, C., Maza, I., Jahuira, M., Pando, A., Mayta, H., y Valderrama, A. (2016). Desarrollo de micropartículas de quitosano cuaternizado y entrecruzado para la adsorción de ácido desoxirribonucleico (ADN). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(4), 467-479.

Berghoff, C.F. (2011). Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Borges, O., Borchard, G., de Sousa, A., Junginger, H. E., y Cordeiro-da-Silva, A. (2007). Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1-2), 254-264.

Bragg, W. H., y Bragg, W. L. (1913). The reflection of X-rays by crystals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 88(605), 428-438.

Bulwan, M., Wójcik, K., Zapotoczny, S., y Nowakowska, M. (2012). Chitosan-based ultrathin films as antifouling, anticoagulant and antibacterial protective coatings. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(15), 1963-1980.

Broussignac, P. (1968). Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chimie et Industrie, Génie Chimique*, 99(9), 1241-1247.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Arguelles Monal, W., Desbrieares, J., y Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.

Campana-Filho, S. P., Britto, D. D., Curti, E., Abreu, F. R., Cardoso, M. B., Battisti, M. V., Sim, P.C., Goy, R.J., Signini, R., y Lavall, R. L. (2007). Extraction, structures and properties of alpha-and beta-chitin. *Química Nova*, 30(3), 644-650.

Curvale, R., Masuelli, M., y Perez Padilla, A. (2008). Intrinsic viscosity of bovine serum albumina conformers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, 133-137.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., y Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981-1014.

Domard, A. y Domard, M. (2002) Chitosan: Structure-properties relationship and biomedical applications polymeric biomaterials, revised and expanded Chitosan Dumitriu, Severian. Marcel Dekker, Inc

Doulabi, A. H., Mirzadeh, H., Imani, M., y Samadi, N. (2013). Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: Physical and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 48-56.

Dhawade, P. P., y Jagtap, R. N. (2012). Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Advances in Applied Science Research*, 3(3), 1372.

Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R., y Rocha, J. (2001). Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(5), 359-363.

Dutta, K. P., Ravi-Kumar, M. N. V., y Dutta, J. (2002). Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science*, 42(3), 307-354.

Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J. M., y Ocio, M. J. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, 34(1), 61-68.

Garrido Assis, O. B., y de Britto, D. (2011). Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. *Polymer International*, 60(6), 932-936.

Giraldo, J. (2013). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano.

Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Pencihé, C., y Higuera-Ciapara, I. (2000). Chitin and chitosan. En: Novel Macromolecules and Food Systems Developments in Food Science Series. D. G. Doxistakis and V. Kiosseoglou (Editores) Series. D. G. Doxistakis and V. Kiosseoglou (Editores). Elsevier Science. pp. 267-305.

Gomaa, M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., y Abdel-Gawad, K. M. (2018). Use of seaweed and filamentous fungus derived polysaccharides in the development of alginate-chitosan edible films containing fucoidan: Study of moisture sorption, polyphenol release and antioxidant properties. Food Hydrocolloids, 82, 239-247.

Heidari, F., Razavi, M., Bahrololoom, M. E., Tahriri, M., Rasoulboroujeni, M., Koturi, H., y Tayebi, L. (2018). Preparation of natural chitosan from shrimp shell with different deacetylation degree. Materials Research Innovations, 22(3), 177-181.

Hidalgo, C., Fernández, M., Nieto, O. M., Paneque, A. A., Fernández, G., y Llópiz, J. C. (2009). Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. Revista Iberoamericana de Polímeros, 10, 1-17.

Hernández Cocolletzi, H., Águila Almanza, E., Flores Agustín, O., Viveros Nava, E. L., y Ramos Cassellis, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. Superficies y Vacío, 22(3), 57-60.

Huang, C. Y., Kuo, C. H., Wu, C. H., Ku, M. W., y Chen, P. W. (2018). Extraction of crude chitosans from squid (*Illex argentinus*) pen by a compressional puffing-pretreatment process and evaluation of their antibacterial activity. Food Chemistry, 254, 217-223.

Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N., y Davis, S. S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews, 51(1-3), 81-96.

Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. S., Nair, S. V., y Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances, 29(3), 322-337.

Kasaai, M. R., Arul, J., y Charlet, G. (2013). Fragmentation of chitosan by acids. *The Scientific World Journal*, 2013.

Kean, T., y Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3-11.

Khan, T., Peh, K., y Ch'ng, H. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 303-311.

Kittur, F. S., Prashanth, K. H., Sankar, K. U., y Tharanathan, R. N. (2002). Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 185-193.

Kumar, S., Koh, J., Tiwari, D. K., y Dutta, P. K. (2011). Optical study of chitosan-ofloxacin complex for biomedical applications. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48(10), 789-795.

Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., y Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567-1636.

Lamarra, J., Rivero, S., y Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Material Science and Engineering C*, 67, 717–726.

Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerro-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., Yépiz-Gómez, M.S., y Plascencia-Jatome, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82, 305-315.

Muzzarelli R.A.A., y Muzzarelli C. (2005). Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. *Advances in Polymer Science*, 186, 151-209.

Muzzarelli, R. A., y Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5(6), 461-472.

Nagpal, M., Maheshwari, D. K., Rakha, P., Dureja, H., Goyal, S., y Dhingra, G. (2012). Formulation development and evaluation of alginate microspheres of ibuprofen. *Journal of Young Pharmacists*, 4(1), 13-16.

Neto C.G.T., Giacometti J.A., Job A.E., Ferreira F.C., Fonseca J.L.C., y Pereira M.R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62, 97-103.

Park, I. K., Ihm, J. E., Park, Y. H., Choi, Y. J., Kim, S. I., Kim, W. J., Akaike, T., y Cho, C. S. (2003). Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly (vinyl pyrrolidone)(PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier: Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex (1). *Journal of Controlled Release*, 86(2-3), 349-359.

Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H., y Acosta, N. (2003). Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 511-520.

Pillai, C. K. S., Paul, W., y Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.

Rahmaninia, M., Rohi, M., Hubbe, M. A., Zabihzadeh, S. M., y Ramezani, O. (2018). The performance of chitosan with bentonite microparticles as wet-end additive system for paper reinforcement. *Carbohydrate Polymers*, 179, 328-332.

Ravi Kumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.

Raymond, L., Morin, F. G., y Marchessault, R. H. (1993). Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, 246(1), 331-336.

Rivero, S. (2012). Estudio y aplicación de películas activas a base de quitosano. Tesis Doctoral, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

Rivero, S., Damonte, L., Garcia, M. A., y Pinotti, A. (2016). An insight into the role of glycerol in chitosan films. *Food Biophysics*, 11(2), 117-127.

Rodríguez, L. B., Ballesteros, M. S., Vega-Baudrit, J., y Camacho, M. (2010). Estudio Cinético de la degradación térmica de quitina y quitosano de camarón de la especie "Heterocarpus Vicarius" empleando la técnica termogravimétrica en modo dinámico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 558-573.

Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S., y Coma, V. (2005). Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science*, 70(2), M100-M104.

Silva-Castro, I., Martín-Ramos, P., Matei, P. M., Fernandes-Correa, M., Hernández-Navarro, S., y Martín-Gill, J. (2017). Eco-Friendly nanocomposites of chitosan with natural extracts, antimicrobial agents, and nanometals. *Handbook of Composites from Renewable Materials, Nanocomposites: Advanced Applications*, 8, 35.

Singla, A. K., y Chawla, M. (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(8), 1047-1067.

Smith, J., Wood, E., y Dornish, M. (2004). Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical Research*, 21(1), 43-49.

VandeVord, P. J., Matthew, H. W., DeSilva, S. P., Mayton, L., Wu, B., y Wooley, P. H. (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 59(3), 585-590.

Xia, W., Liu, P., Zhang, J., y Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179.

Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., y Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 292-297.

Yuan, G., Chen, X., y Li, D. (2016). Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International*, 89, 117-128.

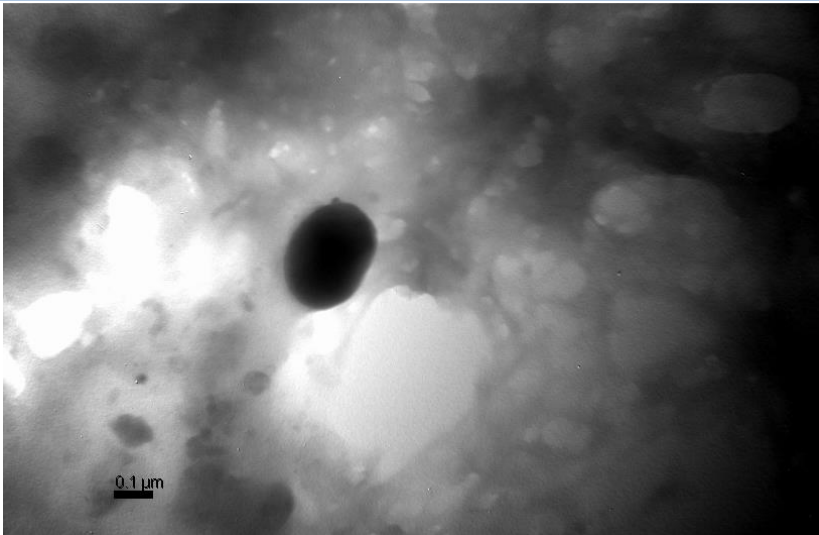
Zaharoff, D. A., Rogers, C. J., Hance, K. W., Schlom, J., y Greiner, J. W. (2007). Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine*, 25(52), 8673-8686.

Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., y Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114-120.

Zargar, V., Asghari, M., y Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204-226.

Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., y Zhang, X. (2005). Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340(11), 1914-1917.

Capítulo 2



Capítulo 2

2.1 Introducción

Los polifenoles son un grupo de compuestos generados a partir del metabolismo secundario de los vegetales (Rodríguez y col., 2005). Se caracterizan por poseer al menos un anillo bencénico y uno o varios grupos hidroxilos. Los polifenoles se clasifican fundamentalmente en compuestos no flavonoides, entre los que se encuentra el ácido gálico. Recientemente, la investigación y la aplicación de polifenoles en el área de alimentos funcionales y en industrias farmacéuticas y nutraceútica han atraído un gran interés debido a sus potenciales beneficios para la salud. El ácido gálico (AG, ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico) (Figura 2.1 a y b) se encuentra naturalmente presente en el reino vegetal especialmente en té, uvas, bayas, y otras frutas, así como en el vino. Diversos estudios, señalan que estos compuestos exhiben un amplio espectro de propiedades bioquímicas, como agente antioxidante, antimicrobiano y anti-inflamatorio, además de tener efectos anticancerígeno y neuroprotector (Verma y col., 2013). El AG tiene un alto potencial de reducción y es capaz de capturar especies radicalarias, lo cual explica su capacidad antioxidante (Pasanphan y col., 2008; Schreiber y col., 2013). Estas funciones llevan a que sea ampliamente utilizado en alimentos, medicamentos y cosméticos (Nagpal y col., 2012; Xie y col., 2014).

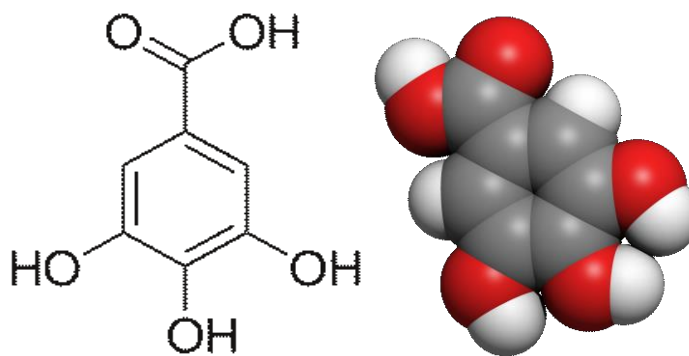


Figura 2.1. a) Estructura química del ácido gálico; **b)** geometría molecular del ácido gálico.

La inclusión de extractos polifenólicos con concentraciones superiores a las presentes en los alimentos se ve obstaculizada por diversas causas como mal sabor, pobre estabilidad y

solubilidad reducida. En este contexto, la encapsulación ayuda a superar estas limitaciones inmovilizando compuestos fenólicos en estructuras poliméricas permitiendo de esta manera modular la liberación de principios activos. Asimismo, la implementación de esta tecnología contribuye a mejorar la estabilidad del compuesto frente a la oxidación, dirigir la administración del compuesto activo a un sitio específico, enmascarar olores e incrementar su solubilidad en alimentos líquidos (Konecsni y col., 2012).

La nanotecnología ha desencadenado una amplia variedad de posibilidades en relación a la obtención de productos innovadores como materiales funcionalizados con compuestos activos nanoencapsulados. En esta dirección, Patel y col. (2010) y Pinheiro y col. (2015) evaluaron las habilidades de las matrices biopoliméricas para preservar los compuestos incorporados frente a procesos como la termo y la foto-degradación. Como estrategia, la nanoencapsulación de moléculas bioactivas comprende la formación de partículas coloidales sólidas de tamaño nanométrico funcionalizadas con compuestos activos, los cuales pueden estar atrapados, encapsulados, adsorbidos o químicamente unidos (Jawahar y Meyyanathan, 2012). En este sentido, las nanopartículas se pueden emplear como vehículos para liberación sostenida de compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos.

El término nanopartícula es usado comúnmente tanto para nanoesferas, como para nanocápsulas dependiendo el proceso utilizado para su obtención (Figura 2.2). Las nanoesferas son partículas cuya masa es sólida y el principio activo puede estar disperso o adsorbido a la superficie de la esfera o encapsulado uniformemente dentro de la partícula (Rao y Geckelera, 2011). Las nanocápsulas son sistemas vasculares que actúan como un tipo de reservorio, y el principio activo se confina en una cavidad constituida por un núcleo líquido (aceite o agua), rodeado por una membrana polimérica. En este caso, la sustancia activa se disuelve en el núcleo interior. Sin embargo, el principio activo también puede estar adsorbido a la superficie de la cápsula (Jawahar y Meyyanathan., 2012).

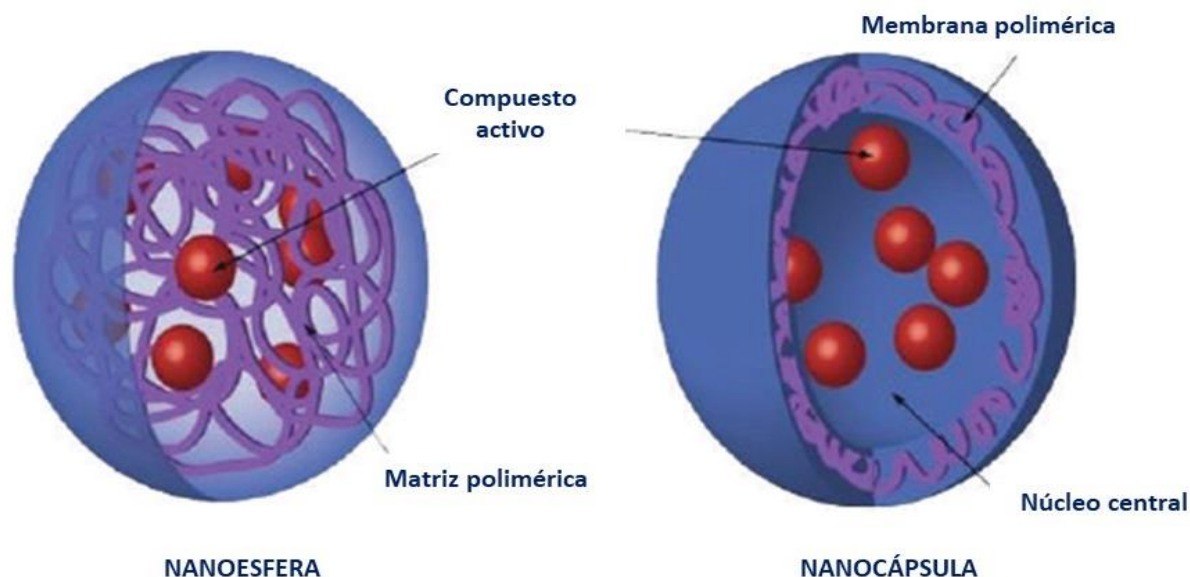


Figura 2.2. Esquema representativo mostrando los dos tipos principales de nanopartículas poliméricas: nanoesfera (sistema matricial) y nanocápsula (sistema reservorio) con diferentes modalidades de carga del compuesto activo. Adaptado de Christoforidis y col. (2012).

En otro orden de cosas, el uso del quitosano se ha incrementado en el campo de la administración de compuestos activos. Como ya se describió en la sección 1.1 del *Capítulo 1*, el quitosano es un copolímero policatiónico soluble en medio ácido producto de la protonación de los grupos amino. La presencia de grupos amino reactivos permite la modificación química del biopolímero para diseñar micro y nanopartículas. La carga positiva del polímero hace posible la preparación de nanopartículas por gelificación ionotrópica con aniones multivalentes, como el tripolifosfato de sodio (TPP) (Calvo y col., 1997; Jonassen y col., 2012). La interacción del quitosano con el TPP da lugar a la formación de nanopartículas de quitosano reticuladas y biodegradables. De acuerdo a Goycoolea y col. (2009), las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo *bottom-up* como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares. La densidad de entrecruzamiento, la cristalinidad y la hidrofiliidad del quitosano reticulado permiten modular la liberación de compuestos activos

y ampliar su gama de potenciales aplicaciones en la administración de fármacos basado en el diseño de nanopartículas. En estas nanopartículas el compuesto activo puede estar atrapado o ligado a la matriz polimérica. Las metodologías más comunes a partir de las cuales es posible diseñar nanopartículas a base de quitosano se presentan en la Figura 2.3.

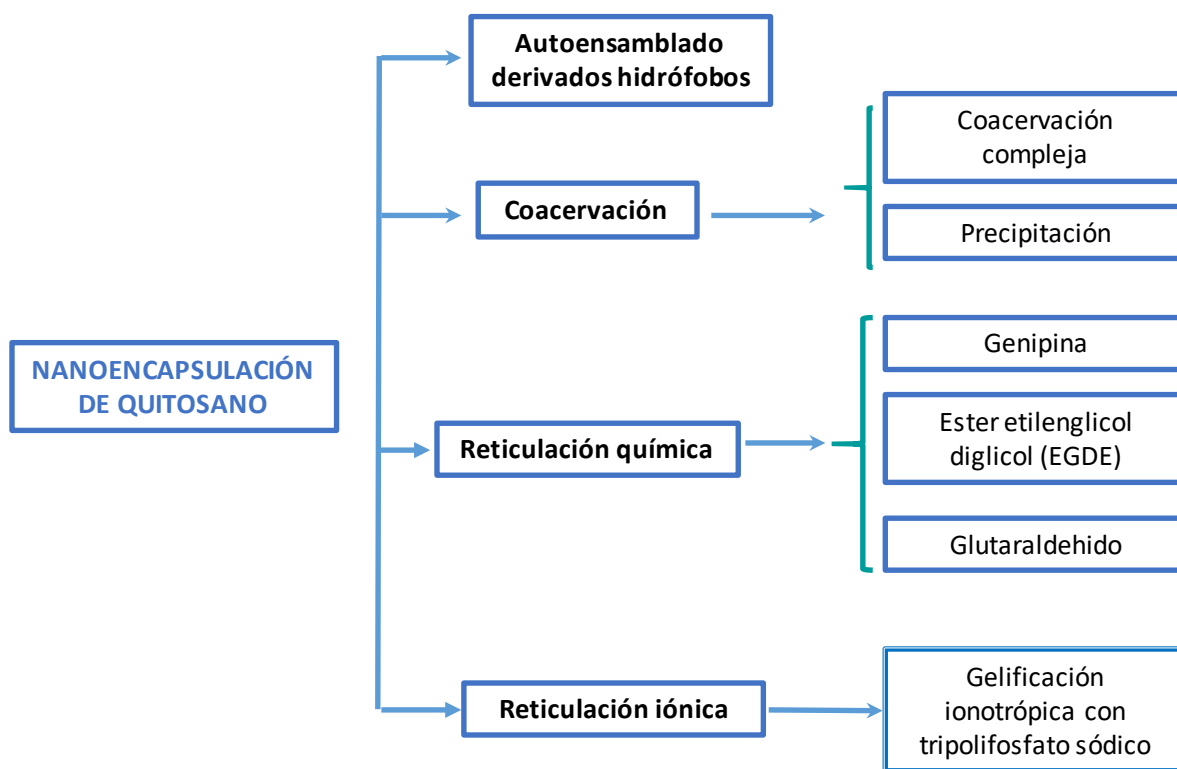


Figura 2.3. Métodos utilizados para preparar nanopartículas de quitosano adaptado de Goycoolea y col. (2009).

Hassanovic y col. (2009) y Stulzer y col. (2009) explicaron que las nanopartículas proveen una protección a los compuestos encapsulados frente a la acción del calor o la degradación inducida por la luz, probablemente debido a que se trata de estructuras más compactas (Teng y col., 2013). El quitosano ha sido ampliamente utilizado como macromolécula encapsulante de compuestos bioactivos, tales como vitaminas y minerales (Agnihotri y col., 2004; Alishahi y col., 2011; Luo y col., 2010), catequinas (Tang y col., 2013) y proteínas (Papadimitroiu y col., 2012). Asimismo, los complejos antioxidante-quitosano demostraron poseer bioactividad, capacidad antioxidante, anticancerígena, entre otras, así como efecto

inhibitorio de enzimas digestivas, β -secretasa y patógenos presentes en los alimentos (Xie y col., 2014).

En la formulación de nanocápsulas cargadas con compuestos activos se deben tener en cuenta diferentes variables tales como, concentración de agente encapsulante, (de Pinho Neves y col., 2014; Zhang y col., 2009), concentración de agente activo y (en caso de ser utilizado) cantidad de agente entrecruzante (de Pinho Neves y col., 2014). Debido a la cantidad de variables a tener en cuenta en el proceso de obtención de nanopartículas de quitosano, es de vital importancia realizar un diseño que permita optimizar variables significativas para la formación de nanocápsulas (Zhang y col., 2009). Generalmente se recomienda la utilización de un modelo que presente curvatura, como el modelo de tipo polinomial, de orden 2 o mayor, que permita una eficiente curvatura del mismo (Bezerra y col., 2008). La diferencia entre una ecuación de superficie de respuesta y la ecuación de un diseño factorial es la adición de los términos cuadráticos que permiten modelar la curvatura. Uno de los diseños que cumple con este requisito es el diseño central compuesto (DCC). Un diseño central compuesto consiste en un diseño factorial que engloba puntos axiales para estimar la curvatura y puntos centrales que permiten evaluar la reproducibilidad experimental. Los puntos centrales se seleccionan para obtener varias propiedades, tales como capacidad de giro o de ortogonalidad a fin de adaptarse a polinomios de segundo grado (Ghoreishi y col., 2012). Esta herramienta estadística reduce el número de experimentos empíricos que son necesarios para identificar una tendencia matemática en el diseño experimental, lo que facilita la determinación del óptimo nivel de factores variables requeridos para una respuesta dada (Zhang y col., 2009). El DCC es uno de los diseños más utilizados debido a su flexibilidad. Ha sido aplicado con éxito a la optimización de diversos bioprocesos (Amenaghawon y col., 2014; Fiorda y col., 2015).

Entre los diferentes tipos de diseño experimental, la metodología de superficie de respuesta (RSM) se ha convertido en el método estándar para diversos experimentos llevados a cabo con fines de optimización. La RSM se refiere sobre todo a la aproximación de una función compleja desconocida mediante un polinomio generalmente de primer o

segundo orden. En consecuencia, los diseños para el montaje de estos modelos son de considerable interés y permiten la estimación de interacciones, incluyendo efectos cuadráticos y, por lo tanto, nos da una idea de la forma de la superficie de respuesta.

La optimización de variables como alternativa técnico-económica para la encapsulación de compuestos activos requiere la combinación adecuada de las variables de operación y matriz polimérica soporte que permita la preservación del bioactivo. Para lograr este propósito la metodología de superficie repuesta ofrece una herramienta para generar modelos que relacionen combinaciones complejas de variables de entrada y salida, basadas en diseños experimentales con un número razonable de ensayos.

Es importante señalar que a pesar de la diversidad de métodos documentados y compuestos disponibles para obtener nanopartículas a base de quitosano, son escasos los sistemas que ofrecen un potencial real de nanopartículas activas de Q en aplicaciones alimentarias. Por lo tanto, se plantea un proceso de optimización para lograr una formulación adecuada de nanopartículas que permita su posterior ensamblado con una matriz polimérica.

En este marco, los objetivos planteados en este Capítulo fueron:

- Optimizar parámetros de diseño para encapsular AG en micro y nanoestructuras a base de quitosano y modelar matemáticamente las respuestas obtenidas para las distintas formulaciones siguiendo una metodología de superficie de respuesta (RSM).
- Evaluar el efecto de las variables de obtención de micro y nanopartículas funcionalizadas (concentración de quitosano, relación Q:TPP, y concentración de AG) a través del análisis de los valores de potencial zeta de las suspensiones resultantes y el porcentaje de eficiencia de encapsulación de las partículas.
- Analizar la estabilidad física de las suspensiones mediante medidas de dispersión de luz, tamaño de partículas y turbidez.
- Estudiar las interacciones establecidas entre los componentes del sistema de partículas a través de la técnica de FTIR.

2.2 Materiales y métodos

Las nanopartículas de quitosano (Q) se obtuvieron mediante gelificación ionotrópica utilizando tripolifosfato sódico (TPP) de grado analítico proporcionado por Anedra (Buenos Aires, Argentina) como contra ion, siguiendo el método descrito por Calvo y col. (1997) con algunas modificaciones (Figura 2.4). Las nanopartículas se formaron espontáneamente por adición gota a gota de una disolución de TPP a una solución polimérica de Q preparada por solubilización en ácido acético (Anedra, Argentina) y funcionalizada con ácido gálico (AG) (Anedra, Argentina). Una vez que este proceso se completó, las suspensiones obtenidas fueron homogeneizadas a 13.500 rpm durante 10 min mediante el uso de un homogeneizador Ultraturrax T-25 (Janke y Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania).

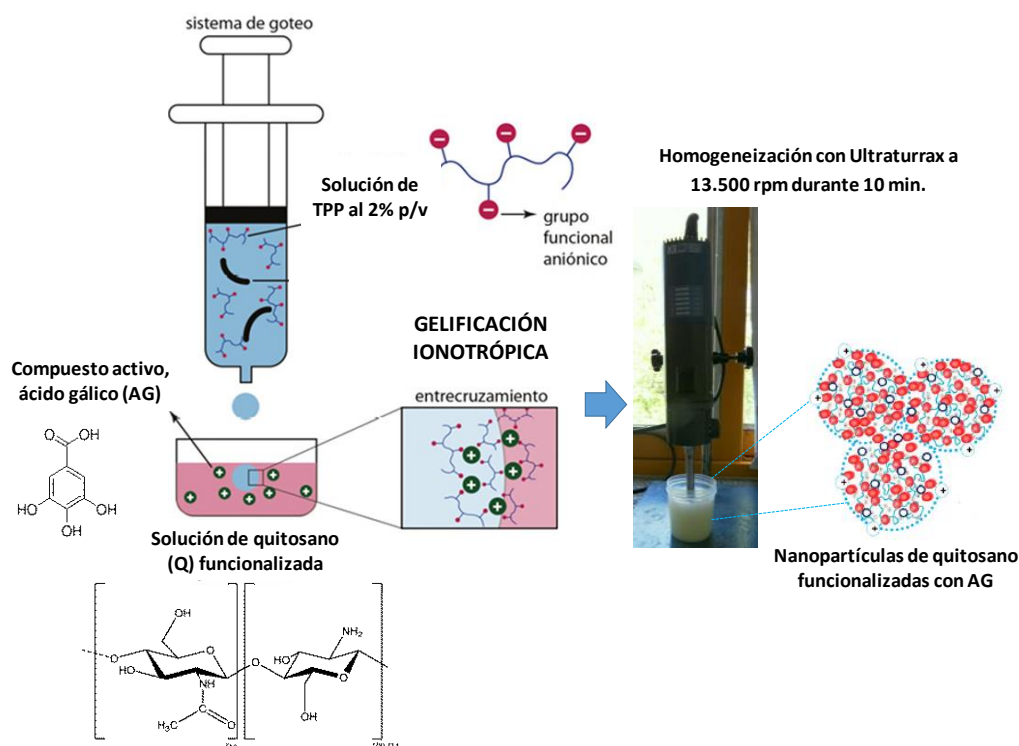


Figura 2.4. Etapas involucradas en la síntesis de nanopartículas de quitosano funcionalizadas con ácido gálico.

En la Tabla 2.1 se presenta la nomenclatura utilizada de aquí en adelante para las distintas suspensiones de nanopartículas de quitosano cargadas con AG las cuales se denominaron N_1 , N_2 , ..., N_n con $n=15$.

2.2.1 Caracterización de la suspensión de nanopartículas

2.2.1.1 Porcentaje de eficiencia de encapsulación (PEE)

El porcentaje de eficiencia de encapsulación es una medida de la cantidad de compuesto activo que se encuentra protegido por la matriz polimérica de la exposición frente a distintos factores externos que puedan afectar al mismo (Hasanovic y col., 2009).

Para determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación (PEE), las nanopartículas se aislaron de la suspensión mediante centrifugación a 20.000 rpm durante 20 min (BeckmanCoulter Optima L-100XP Floorcentrifugation Sistem, California, USA.). Las muestras se filtraron usando un filtro de Nylon estéril de 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA, USA). Para determinar el máximo de absorción del AG, se realizó un barrido de longitudes de onda en la región UV en el rango comprendido entre 200 y 400 nm (Figura 2.5 a). La concentración de AG tanto en el sobrenadante como en el precipitado se cuantificó con un espectrofotómetro DU650 (Beckman, USA) mediante una curva de calibración realizada con una solución patrón de ácido gálico midiendo la absorbancia a 269 nm de acuerdo al máximo de absorción identificado (Nagpal y col., 2012) (Figura 2.5 b). Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

El PEE fue determinado a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{PEE} = \frac{(W_i - W_s)}{W_i} \times 100 \quad [2.1]$$

donde:

W_i es la concentración inicial de AG y W_s es la masa del compuesto activo presente en el sobrenadante.

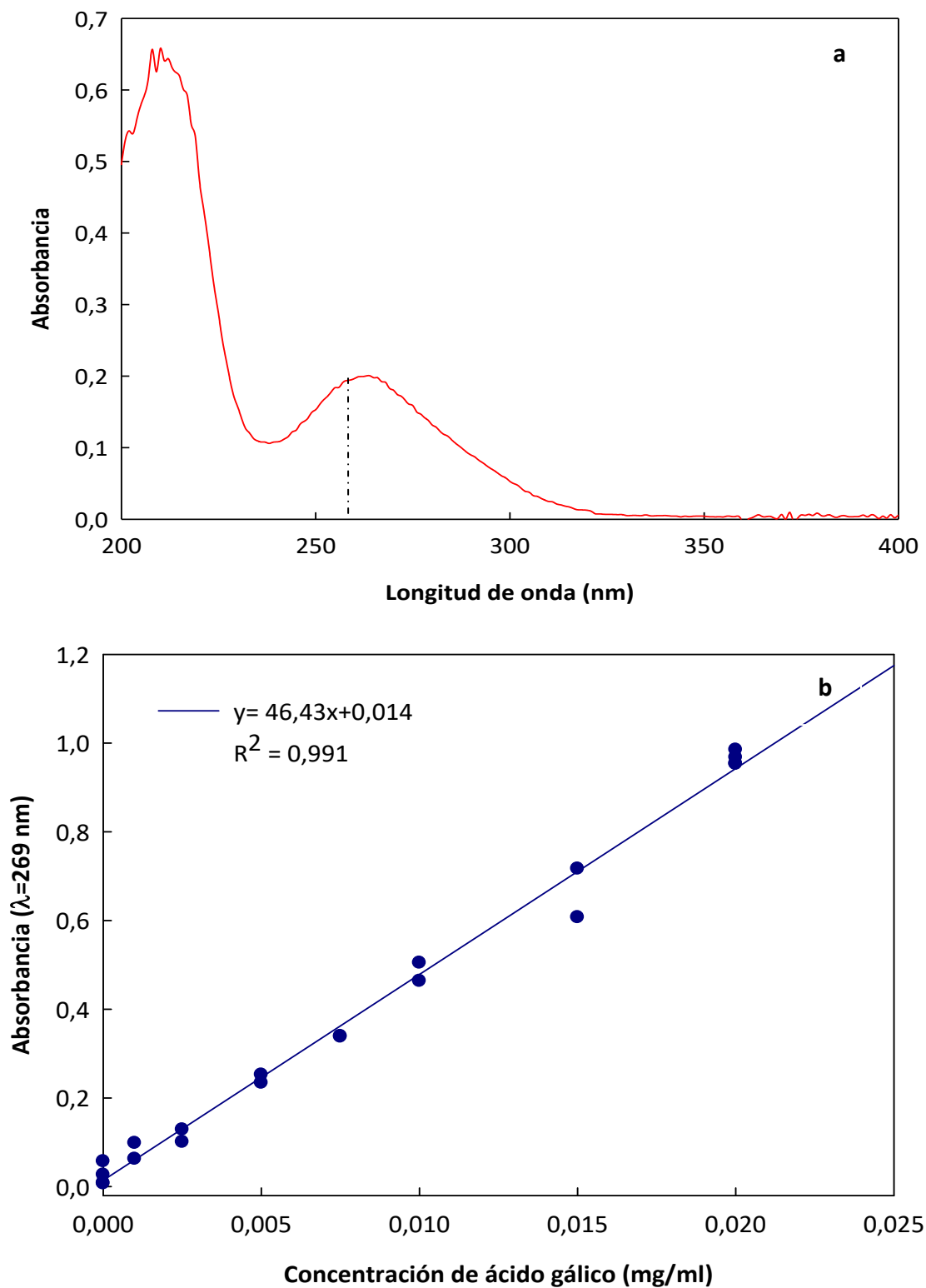


Figura 2.5. a) Espectro de absorción de una solución de AG; b) curva de calibración de AG.

2.2.1.2 Potencial zeta, tamaño de partícula e índice de polidispersidad

La determinación del potencial zeta da información acerca de la distribución de cargas eléctricas superficiales en la interfase sólido/líquido. Para explicar el fundamento de la técnica se debe considerar el modelo de la doble capa eléctrica, esquematizado en la Figura 2.6. Este modelo establece que la interfase sólido/líquido está compuesta por dos capas, una de ellas presenta un decaimiento lineal del potencial eléctrico, el cual permanece constante aún cuando las partículas están en movimiento y otra llamada, capa difusa, en la cual el decaimiento es exponencial. Esto explica la existencia de un plano de referencia ubicado entre la capa fija y la capa difusa, siendo el potencial de este plano el potencial zeta.

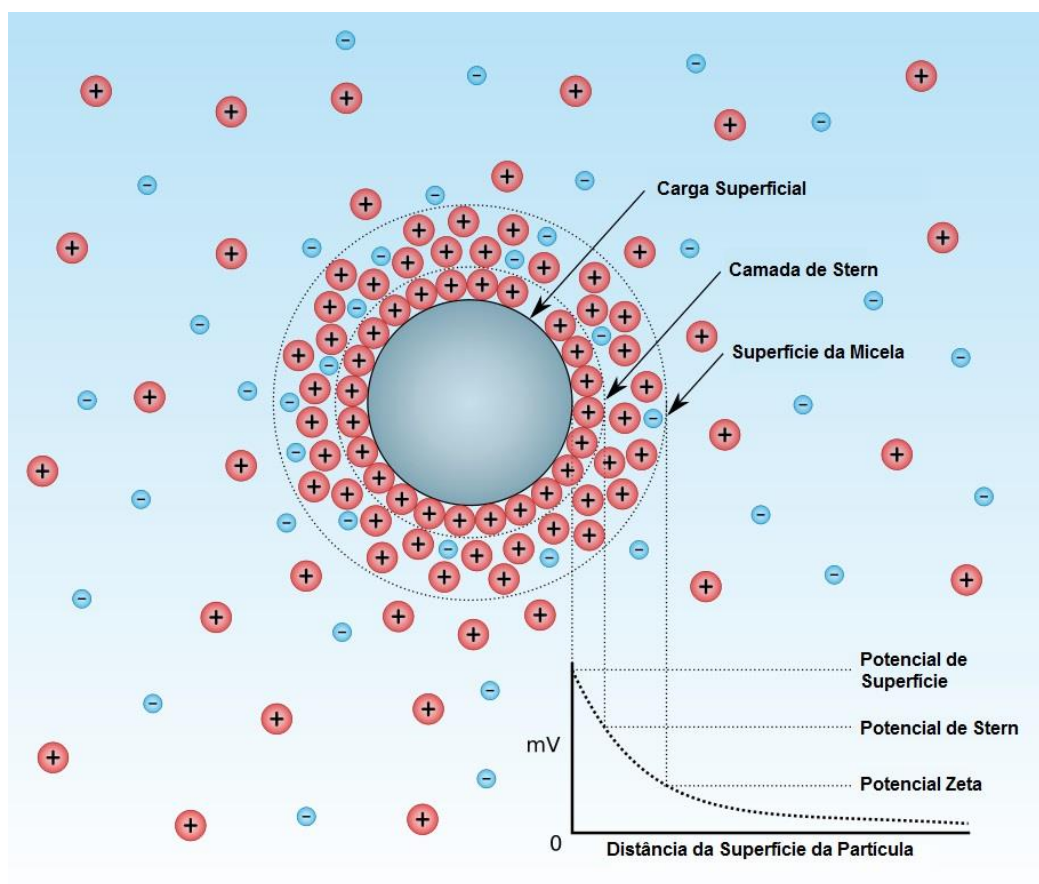


Figura 2.6. Esquema ejemplificando la distribución de carga superficial de una partícula.

En suspensiones acuosas de coloides, las partículas adquieren carga eléctrica superficial debido a un desbalance eléctrico provocado por la ruptura de enlaces en la superficie. Esto genera una concentración de contraiones en la solución en la cercanía de la superficie de las partículas. Esta concentración disminuye al incrementar la distancia entre partículas, provocando una diferencia de potencial entre la superficie del mineral y el seno de la solución (Mantilla y col., 2008)

El potencial zeta matemáticamente se expresa por la ecuación de Helmholtz–Smoluchowski (Hunter, 2013):

$$\zeta = \frac{u \eta}{\varepsilon_0 \varepsilon E} \quad [2.2]$$

Dónde: ζ es el potencial zeta, u es la velocidad de la partícula, η es la viscosidad del líquido, ε_0 es la permitividad en el vacío, ε es la permitividad en el medio y E es la fuerza del campo eléctrico.

El potencial zeta (PZ) y el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se determinaron por dispersión dinámica de luz a través del uso de un equipo Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments, Worcestershire, England) provisto de un haz de laser He/Ne a 633 nm a un ángulo fijo de dispersión de 173° y un correlador digital modelo ZEN3600. La muestra se colocó en una celda dentro del compartimento tal como se observa en la Figura 2.7.

Mediante dispersión dinámica de luz (DLS), la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las mismas.

El PZ se determinó a través de la medición de la dirección y la velocidad del movimiento de las partículas en un campo eléctrico bien definido. Antes del análisis se determinó el índice de refracción mediante el uso de un refractómetro digital (Atago, USA) y la conductividad usando un instrumento de medición de pH y conductividad (Mettler Toledo Udorf, Suiza).

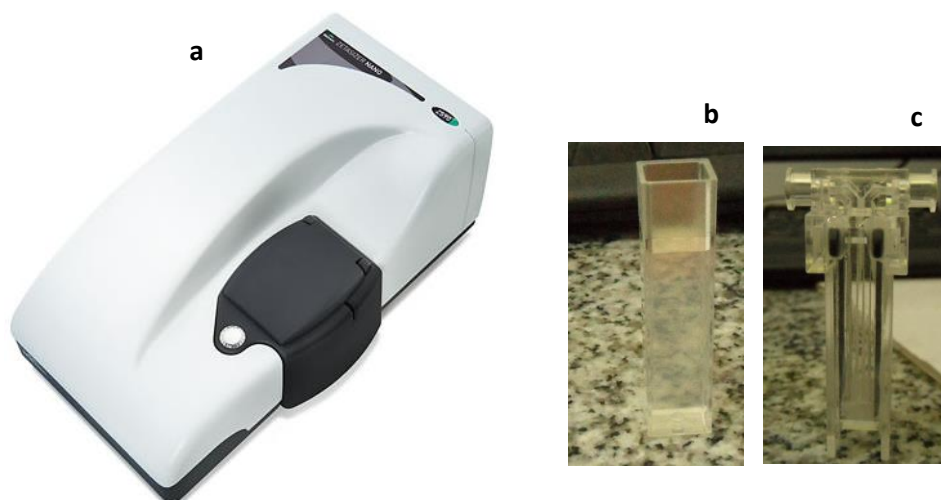


Figura 2.7. a) Equipo de dispersión dinámica de luz láser utilizado para las medidas de potencial zeta (PZ) y tamaño de partícula y; b) celdas de medición de tamaño de partícula; c) celdas de medición de PZ.

Los valores de potencial zeta informados corresponden al valor promedio con su respectiva desviación estándar de medidas llevadas a cabo por duplicado, realizando para cada muestra al menos cinco determinaciones.

Por otra parte, el índice de polidispersidad (IPD) es un parámetro que permite definir la distribución de tamaño proveniente del análisis de la correlación espectroscópica de fotones. Es un número adimensional extrapolado de la función autocorrelación y su rango varía desde 0,01 para partículas monodispersas hasta 0,5-0,7. Muestras con una distribución amplia de tamaños tienen valores de IPD mayores que 0,7 indicando que la distribución es altamente polidispersa (Gaumet y col., 2008; Janardhanan y col., 2008).

2.2.2 Estimación de las superficies de respuestas

2.2.2.1 Diseño experimental empleado

Se empleó un diseño Box-Wilson central compuesto rotatable (Box y col., 2005), comúnmente llamado diseño central compuesto rotatable (DCCR). Este diseño resulta de la combinación de un diseño factorial con puntos centrales y axiales (Figura 2.8)

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una estrategia de experimentación secuencial y modelado matemático que permite estimar las condiciones óptimas de operación de un proceso. Teniendo en cuenta esta premisa, la optimización del proceso fue llevada a cabo utilizando un diseño experimental mediante RSM. Se usó un diseño central compuesto de 3 factores y 3 niveles con 14 experimentos y el punto central replicado cuatro veces (Box y col., 2005). La Tabla 2.1 muestra las concentraciones reales (actuales) y codificadas, variando los factores Q, Q:TPP y AG desde 0,33 a 1,17 % p/v, 1 a 5, y 8 a 92 mg AG/g Q respectivamente. Los principales factores que podrían afectar el tamaño de las nanopartículas y el porcentaje de eficiencia de encapsulación son: la concentración de quitosano, la concentración del compuesto activo y la relación entre la concentración de quitosano y el tripolifosfato de sodio (Q:TPP).

Si la distancia desde el centro del espacio de diseño a un punto factorial es de ± 1 unidad de cada factor, la distancia desde el centro del espacio de diseño a un punto axial es de $\pm \alpha$, con $\alpha > 1$. El valor preciso de α depende de las propiedades deseadas para el diseño y del número de factores implicados. El diseño central compuesto se puede hacer rotatable estableciendo los valores de los puntos axiales como $\alpha = (2k)^{1/4}$.

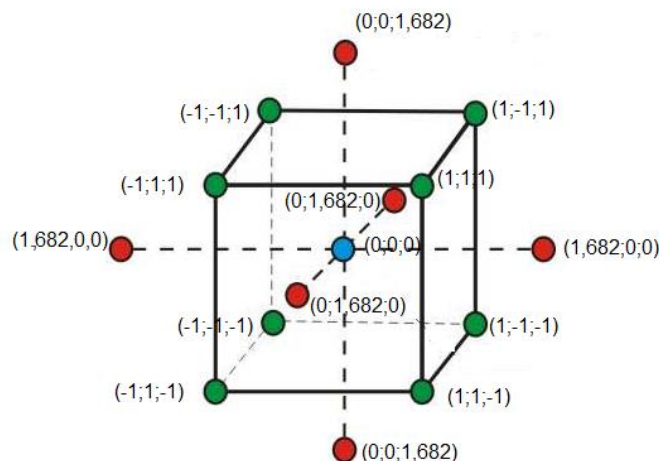


Figura 2.8 Esquema del diseño factorial utilizado.

La representación gráfica del comportamiento del sistema en tres dimensiones, llamada superficie de respuesta, se utilizó para describir los efectos de interacción de las variables sobre el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación. Estas respuestas fueron el resultado de las influencias individuales y las interacciones de las tres variables independientes.

Para predecir las condiciones óptimas, se usó un polinomio de segundo orden para establecer la relación entre las variables independientes y la respuesta obtenida para el PZ y el PEE. Para los tres factores analizados, se obtuvo la siguiente ecuación en forma genérica:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad [2.3]$$

donde,

y es la respuesta en función de x_1 , x_2 y x_3 , variables independientes codificadas, β_0 es un término constante, β_1 , β_2 y β_3 son los coeficientes lineales, β_{11} , β_{22} y β_{33} son los coeficientes de los términos cuadráticos y β_{12} , β_{13} y β_{23} son los coeficientes correspondientes a las interacciones.

Asimismo, se realizaron cuatro replicados (corridas 15 a 18) del punto central (15) con la finalidad de estimar el error puro de la varianza (Myers y col., 2016). Una vez ajustado el modelo, se llevó a cabo el análisis de residuos para validar las suposiciones realizadas en el

análisis de varianza y para identificar valores atípicos examinando gráficos de diagnósticos tales como los de residuos.

La proporción de la varianza explicada por los modelos obtenidos fue dada por el coeficiente de determinación múltiple R^2 y el coeficiente de determinación ajustado R^2_{adj} , mientras que la idoneidad del modelo se determinó por una prueba de falta de ajuste (*lack of fit*).

Todos los análisis estadísticos, generación de superficies de respuestas, análisis funcional de deseabilidad, optimización, gráficos 3D y de control fueron realizados mediante el uso del programa estadístico Design Expert (versión de prueba 7.1.6 Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA).

Para minimizar la influencia de la variabilidad inexplicable en las respuestas, los experimentos se realizaron en forma aleatoria. Los resultados de estos experimentos se compararon usando un análisis de varianza (ANOVA) (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, USA), capaz de determinar si los factores y la interacción entre los mismos resultan significativos. Los datos experimentales se informaron como valores promedio con sus correspondientes desviaciones estándar. Para la comparación por pares se eligió la prueba de la diferencia menos significativa (LSD). Las diferencias se consideraron significativas en el test-F cuando el nivel de significación fue menor que 0,05.

Tabla 2.1 Diseño central compuesto (DCC) de las tres variables independientes. Los tres factores experimentales se estudiaron a tres niveles. Las variables fueron: concentración de quitosano (p/v), relación quitosano:tripolifosfato (Q:TPP) y concentración de ácido gálico expresada como mg AG/g Q.

Formulaci ón (Nn)	Q (%)	Q:T PP	mg AG/gQ	Q (%)	Q:TPP	mgAG/g Q
Variables codificadas			Variables actuales			
1	-1	-1	-1	0,5	1,81	25
2	-1	-1	1	0,5	1,81	75
3	-1	1	-1	0,5	4,19	25
4	-1	1	1	0,5	4,19	75
5	1	-1	-1	1	1,81	25
6	1	-1	1	1	1,81	75
7	1	1	-1	1	4,19	25
8	1	1	1	1	4,19	75
9	1,682	0	0	0,33	3	50
10	1,682	0	0	1,17	3	50
11	0	-1,682	0	0,75	1	50
12	0	1,682	0	0,75	5	50
13	0	0	-1,682	0,75	3	8
14	0	0	1,682	0,75	3	92
15	0	0	0	0,75	3	50
16	0	0	0	0,75	3	50
17	0	0	0	0,75	3	50
18	0	0	0	0,75	3	50

2.2.3 Análisis de la estabilidad de las suspensiones

La estabilidad global de las suspensiones fue estudiada mediante dispersión de luz utilizando un analizador óptico vertical de barrido QuickScan (Beckman Coulter, Fullerton, USA) a temperatura ambiente. De esta manera es posible realizar el seguimiento de la evolución física del proceso sin perturbar el sistema original y con buena exactitud y reproducibilidad (Camino y Pilosof, 2011; Cerimedo y col., 2010).

Las suspensiones se colocaron en una celda cilíndrica de vidrio y se escanearon desde la parte inferior hasta la parte superior del tubo con una fuente de luz monocromática ($\lambda=850$ nm) en función de la altura del tubo conteniendo la muestra (65 mm) en condiciones estáticas. Se registraron la luz transmitida y la luz retrodispersada cada 4 segundos realizando 1620 adquisiciones por corrida de un sistema atravesado por un pulso de luz correspondiente al infrarrojo cercano.

En este método, dos sensores ópticos sincronizados registraron simultáneamente la luz transmitida (T) a través de la muestra (0° desde la luz incidente) y la luz retrodispersada (BS) por la muestra (135° desde la radiación incidente) (Figura 2.9). Estos datos se representan cómo % de Transmitancia (T) o BS en función de la altura del tubo (mm).

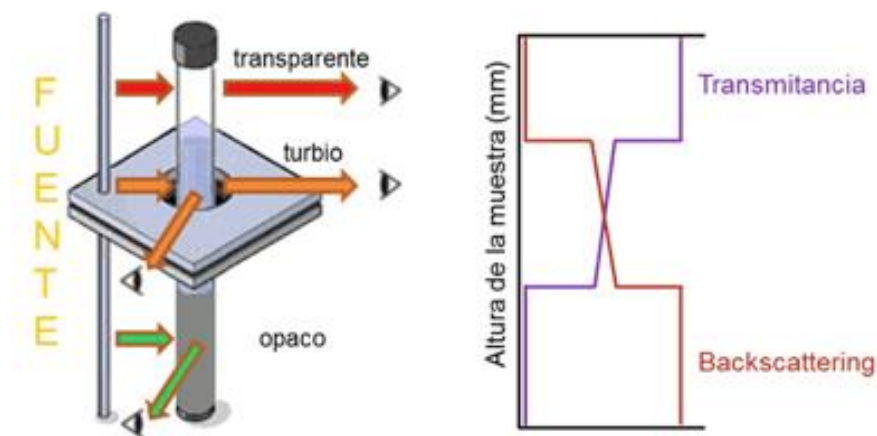


Figura 2.9: Esquema del fundamento de medición del analizador vertical QuickScan utilizado para medir estabilidad de emulsiones y/o suspensiones de partículas.

A partir de los perfiles obtenidos, los valores promedio de transmitancia se determinaron en la zona comprendida entre 20 y 50 mm, correspondiente a la parte media del tubo. Las medidas fueron realizadas al menos por duplicado.

2.2.4 Propiedades ópticas

La turbidez (τ) de una suspensión de partículas es una medida de la reducción de la intensidad de la luz transmitida debido a la dispersión y puede ser calculada usando la ley de Lambert-Beer. La turbidez es un parámetro de vital importancia en la caracterización de diferentes nanopartículas y nanovehículos ya que se correlaciona con el tamaño de las nanocápsulas (Elsayed y col., 2011).

La transmitancia de las suspensiones de nanopartículas se determinó a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Beckman DU650 (Palo Alto, CA, USA) a una longitud de onda (λ_T) de 500 nm.

La turbidez (τ) ha sido definida por Melik y Fogler (1983) y Jonnasen y col. (2012) como se detalla en las siguientes ecuaciones:

$$A = -\log T \frac{I}{I_0} \quad [2.4]$$

$$\tau = \frac{1}{l} \ln \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad [2.5]$$

donde,

l es la longitud del camino de dispersión en la celda (1,0 cm en la cubeta de cuarzo) y I_0 e I son las intensidades de la radiación incidente y transmitida, respectivamente.

2.2.5 Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)

Películas de quitosano con agregado de AG (QAG) y nanopartículas cargadas con AG se analizaron mediante la técnica de FTIR. Las películas de Q (0,75%) y Q con la adición de 50 mg_{AG}/g_Q se obtuvieron por moldeo y secado de las soluciones a 37°C en una estufa hasta

alcanzar peso constante. En adición, las suspensiones funcionalizadas con AG correspondientes a las formulaciones presentadas en la Tabla 2.1, fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas. Luego, las suspensiones fueron extendidas y secadas a 37°C para obtener las películas correspondientes. El espectro de FTIR de las películas de suspensiones obtenidas se registraron mediante un espectrofotómetro IR (Nicolet, iS10 ThermoScientific, Madison, USA) en el rango de longitudes de onda comprendido entre 400-4000 cm^{-1} por acumulación de 64 corridas a 4 cm^{-1} de resolución. Los datos fueron analizados usando el programa Omnic 8 (ThermoScientific).

2.2.6 Caracterización morfológica por TEM

El microscopio electrónico de transmisión utiliza una señal para formar la imagen proveniente de los electrones transmitidos a través de la muestra. El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su espesor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

Las características morfológicas de las partículas se examinaron a través de un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEM 1200EX II Jeol, Japan) equipado con una cámara digital (ES500W Erlangshen CCD Gatan) (Figura 2.8). Las nanopartículas se colectaron por centrifugación (Beckman Coulter Optima L-100XP FloorCentrifugation System) a 20.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se descartó, se realizaron sucesivos lavados de las nanopartículas con agua destilada, y las mismas se re-dispersaron en medio acuoso.

Previo a su observación las muestras se diluyeron con agua destilada y se fijaron utilizando una solución de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) preparada al 2% (v/v) seguido de un lavado y deshidratación con un tren de alcoholes desde 30° hasta alcohol absoluto. Brevemente, una gota de suspensión fue ubicada en una grilla de cobre pre-tratada, la cual fue cubierta con una delgada capa de carbón amorfo. El exceso de suspensión fue removido con un papel de filtro y secado a temperatura ambiente.

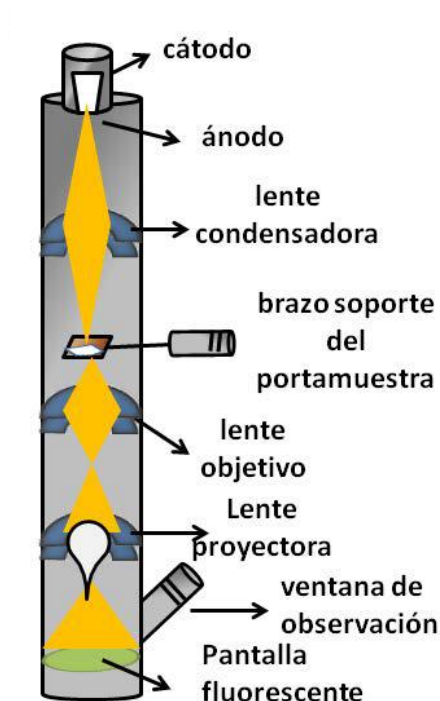


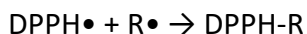
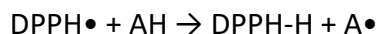
Figura 2.10. Esquema representativo de un microscopio de transmisión electrónica.

2.2.8 Capacidad antioxidante del compuesto activo

La actividad antioxidante fue determinada usando el radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH•) (Sigma-Aldrich, USA) como radical libre.

Se siguió el protocolo de Brand-Williams y col. (1995) con ligeras modificaciones, empleando como medio de reacción una solución de etanol. La reducción del DPPH• se puede monitorear experimentalmente mediante la disminución en la absorbancia a una

longitud de onda característica mientras ocurre la reacción. En su forma estable el radical absorbe a una longitud de onda de 517 nm. Al combinarse con un antioxidante (AH) u otra especie radical ($R\bullet$) el compuesto sufre una reducción y la absorción desaparece debido a la siguiente reacción:



La disminución de la concentración del $DPPH\bullet$ es una medida de la capacidad antioxidante total del compuesto ensayado.

Durante la reacción el radical **DPPH[•]** reacciona transfiriendo un H a la especie antioxidante para formar un radical del antioxidante y la especie estable DPPH (Lou y col., 2012). La reacción se esquematiza en la Figura 2.11:

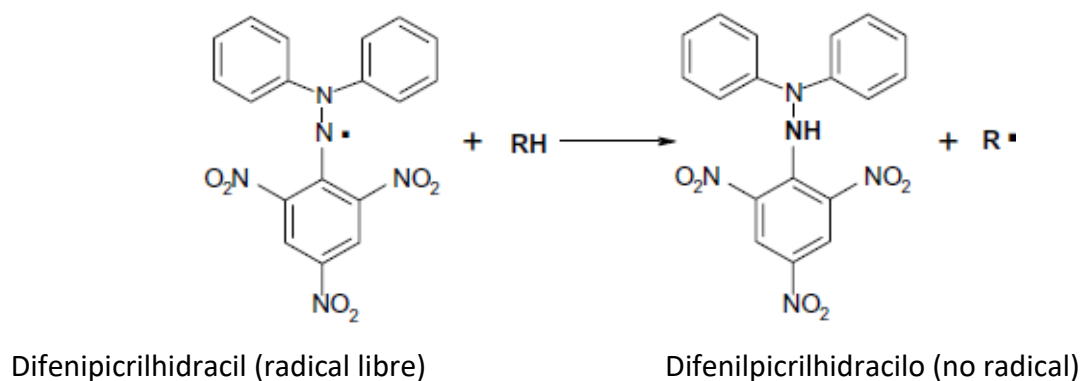


Figura 2.11. Esquema de la reacción de reducción del radical $DPPH\bullet$ por acción del antioxidante RH.

La Figura 2.11 muestra la forma molecular desarrollada de la reacción con formación de radicales libres $R\bullet$ y la reducción del radical DPPH. Para la determinación se preparó una solución de $DPPH\bullet$ con una concentración de 25 mg $DPPH\bullet$ /l etanol.

Simultáneamente, se prepararon soluciones de ácido gálico con diferentes concentraciones en el rango 0-0,035 mg/ml. Con los valores de absorbancia obtenidos se

determinó el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH•), mediante la siguiente expresión:

$$\%Inhibición = \left(\frac{Ab - Am}{Am} \right) * 100 \quad [2.6]$$

donde,

Ab es la absorbancia del blanco correspondiente a la solución de DPPH y Am es la absorbancia de la muestra, conformada por el reactivo de DPPH y la muestra.

El IC₅₀ se determinó a partir del gráfico del porcentaje de inhibición en función de la concentración de ácido gálico, y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales del DPPH.

2.2.9 Capacidad filmogénica

Partiendo de la base de que las partículas se incluirán en una matriz soporte de quitosano se evaluó la capacidad filmogénica de las distintas suspensiones mediante el moldeo de las mismas en recipientes de acrílico y secado en estufa a 37°C hasta peso constante. Una vez que las muestra se secaron, se tomaron fotografías y se evaluó la capacidad de las suspensiones para formar películas.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Preparación y capacidad filmogénica de suspensiones de nanopartículas

El quitosano, por sus características estructurales, es un polímero semicristalino estabilizado a través de enlaces puentes de hidrógeno inter e intramoleculares. En soluciones de ácido acético las moléculas de quitosano adoptan una conformación extendida debido a las repulsiones electrostáticas entre las cadenas poliméricas por la presencia de grupos amino protonados. Teniendo en consideración la reactividad del Q fue posible sintetizar nanopartículas de quitosano mediante la técnica de gelificación ionotrópica con TPP (Gan y

col., 2005; Jonassen y col., 2012). El tripolifosfato sódico es un agente entrecruzante no tóxico, reconocido como GRAS (general recognized as safe) por la FDA (Food and Drug Administration), que es capaz de formar geles al unirse con el quitosano por interacción iónica (Salazar, 2013). El TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) disuelto en agua se disocia en iones tripolifosfóricos y en OH^- y la solución resultante tiene pH 9. Los pKa del TPP son: $\text{pK}_1=1$, $\text{pK}_2=2$, $\text{pK}_3=2,79$, $\text{pK}_4=6,47$ y $\text{pK}_5=9,24$. Los aniones procedentes del TPP ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$, $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$ y $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{-3}$) coexisten en solución acuosa en función del pH. Dependiendo del valor de éste, predominarán unos u otros y de ello dependerá el tipo de interacción que ocurra entre el TPP y el quitosano. Cuando el TPP (pH 9) se disuelve en agua, se disocia en iones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ y, éste a su vez en $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$ y en iones OH^- . Al añadir la solución de este agente entrecruzante a una solución de quitosano (pH ácido 3,85), los iones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ y $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$ compiten con los OH^- por reaccionar con los grupos $-\text{NH}_3^+$ del quitosano mediante entrecruzamiento iónico, en el caso de los iones tripolifosfóricos o por desprotonación, en el caso de los OH^- (Bhumkar y Pokharkar, 2006; Salazar 2013). Cabe señalar que los valores de pH de las suspensiones de nanopartículas obtenidas se encontraron en el rango de 3,9-4,4.

La Figura 2.12 esquematiza la reticulación iónica del quitosano inducida por el TPP y muestra la influencia de las diferentes relaciones Q:TPP en el tamaño y la carga superficial de las partículas. En este sentido, es importante considerar que la estabilidad de las suspensiones, determinada por medidas fisicoquímicas, podría estar afectada como resultado de la interacción entre las nanopartículas cargadas. Consecuentemente, los efectos de la concentración de Q, la relación Q:TPP y la concentración de AG fueron analizados a través de medidas de PZ, PEE, tamaño de partícula, QuickScan y turbidez.

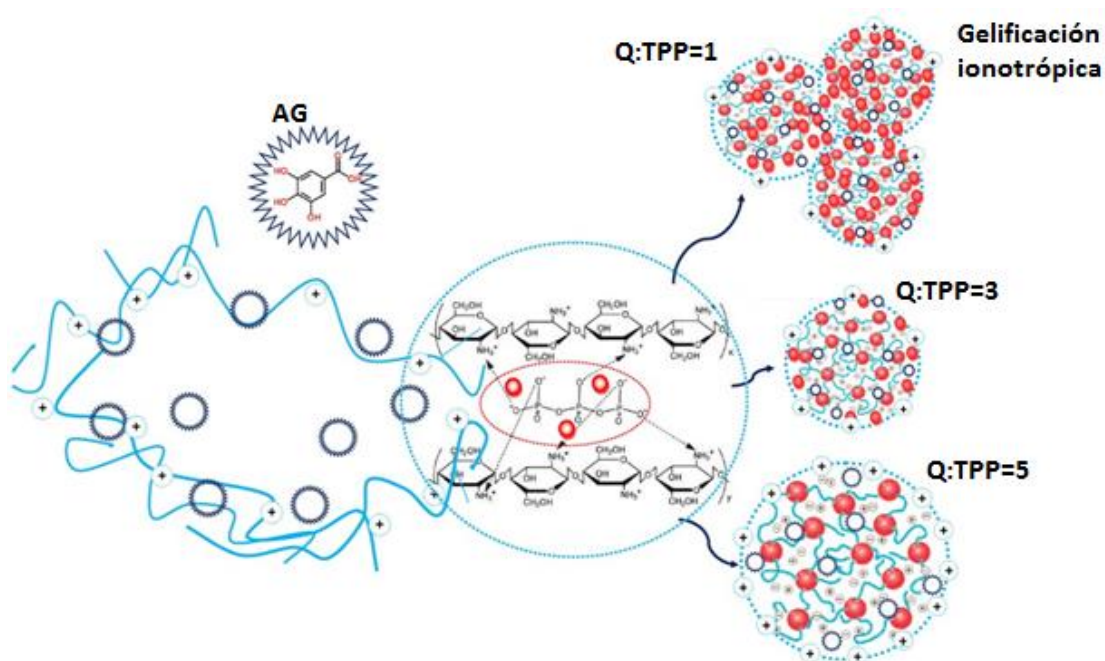


Figura 2.12. Representación esquemática de la reacción de entrecruzamiento iónico entre el quitosano y el TPP encapsulando el compuesto activo (AG).

Las suspensiones de nanopartículas con bajas relaciones Q:TPP (1 o 1,81) no exhibieron capacidad filmogénica, es decir, no fue posible desmoldarlas de las placas de acrílico y obtener una matriz con buena integridad estructural. Estos resultados podrían ser explicados considerando que la presencia de una mayor concentración de TPP capaz de entrecruzar el Q impide la formación de la red polimérica interconectada que da lugar a la formación de la matriz de la película. Se observaron diferencias en la coloración de estas muestras asociadas a la concentración de Q y del compuesto activo presentes en las formulaciones.

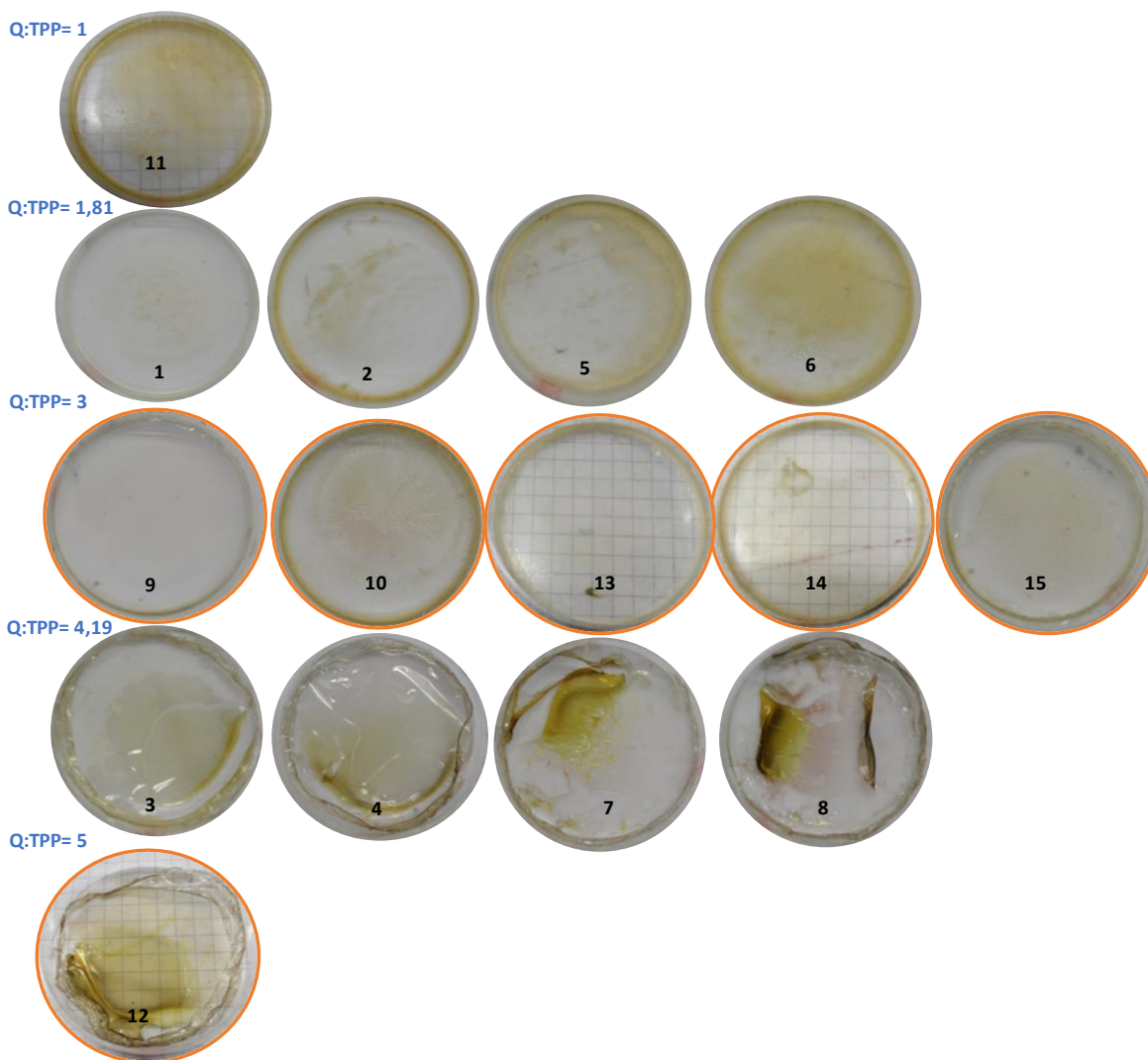


Figura 2.13. Capacidad filmogénica de las suspensiones de nanopartículas a base de quitosano.

Por otra parte, las películas preparadas a partir de suspensiones con relaciones Q:TPP de 4,19 presentaron una marcada separación de fases luego del proceso de secado aún cuando fue posible delmoldarlas de las placas. Se distinguieron zonas claras y oscuras dependiendo la concentración de Q y/o AG presente en cada una de las formulaciones. Este comportamiento se acentuó en las suspensiones N₇ y N₈ que se caracterizaron por tener el doble de concentración de Q (1%) en comparación con las suspensiones N₃ y N₄ (Q= 0,5%). En

definitiva, las películas preparadas con esta relación de Q:TPP no exhibieron una buena integridad estructural.

Por último, relaciones de Q:TPP igual 5 así como intermedias (Q:TPP= 3) permitieron obtener películas fácilmente removibles de las placas de moldeo con buena integridad estructural.

2.3.2 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM) constituye una herramienta efectiva para optimizar un proceso cuando las variables independientes tienen efectos combinados en la respuesta deseada (Bitaraf y col., 2012). Para realizar la misma se optimizó el potencial zeta y el porcentaje de eficiencia de encapsulación obteniéndose los valores resumidos en la Tabla 2.2

Tabla 2.2 Diseño central compuesto (CCD) de tres variables independientes. Los tres factores experimentales fueron estudiados a tres niveles. Las respuestas observadas fueron el potencial zeta (PZ) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (PEE). Las variables fueron: concentración de quitosano (p/v), relación quitosano:tripolifosfato (Q:TPP) y concentración de ácido gálico expresada como mg_{AG}/g_Q.

Formulación (N _n)	Q (% p/v)	Q:TPP	mgAG/gQ	Respuestas observadas	
	Variables actuales			PZ (mV)	PEE
1	0,5	1,81	25	11,0 (1,0) ^a	74,9 (3,3) ^a
2	0,5	1,81	75	9,71(1,3) ^a	83,9(3,3) ^b
3	0,5	4,19	25	36,4(1,9) ^c	83,4 (2,7) ^{b,d}
4	0,5	4,19	75	39,2(2,1) ^c	83,3 (2,7) ^{b,d}
5	1	1,81	25	9,27(1,1) ^a	59,5 (2,9) ^c
6	1	1,81	75	8,89(0,7) ^a	73,6 (3,1) ^a
7	1	4,19	25	44,2(4,0) ^d	74,3 (3,5) ^a
8	1	4,19	75	46,5(3,6) ^d	68,3 (2,7) ^b
9	0,33	3	50	25,5(1,2) ^b	83,9 (2,6) ^b
10	1,17	3	50	20,8(2,1) ^b	64,1 (3,1) ^c
11	0,75	1	50	5,26(0,6) ^a	70,9 (3,3) ^{a,e}
12	0,75	5	50	50,9(3,2) ^d	80,9 (2,1) ^{b,d}
13	0,75	3	8	21,2(1,8) ^b	65,5 (3,8) ^{c,e}
14	0,75	3	92	23,7(0,7) ^b	73,2 (3,4) ^{a,e}
15	0,75	3	50	27,3(1,2) ^b	80,4 (1,8) ^d
16	0,75	3	50	25,9(1,5) ^b	79,5 (2,0) ^d
17	0,75	3	50	27,5(1,4) ^b	79,6 (2,4) ^d
18	0,75	3	50	28,4(1,3) ^b	79,4 (1,9) ^d

* Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre las muestras

Se encontró que el modelo cuadrático fue significativo obteniendo un valor de F_{PZ} de 241,28 y un F_{PEE} de 37,86 ($p < 0,0001$), indicando que las respuestas PZ, PEE y el conjunto de variables independientes (Q, Q:TPP y AG) estuvieron significativamente relacionadas entre sí.

En cuanto al potencial zeta se realizó una transformación logarítmica debido a que la relación entre el valor máximo y el mínimo fue superior a 10. Generalmente, se utilizan transformaciones para estabilizar la varianza, haciendo que la distribución de la variable respuesta se acerque a una distribución normal, mejorando el ajuste de los datos experimentales al modelo (Lee y col., 2015).

Aplicando el análisis de regresión múltiple a los datos de salida de PZ, la ecuación cuadrática, en la cual las interacciones no significativas y los términos (Q×AG), (Q:TPP×AG) y (Q)² fueron removidos, permitieron el mejor ajuste de los datos.

El modelo de regresión en términos de las variables codificadas y actuales, fue el siguiente:

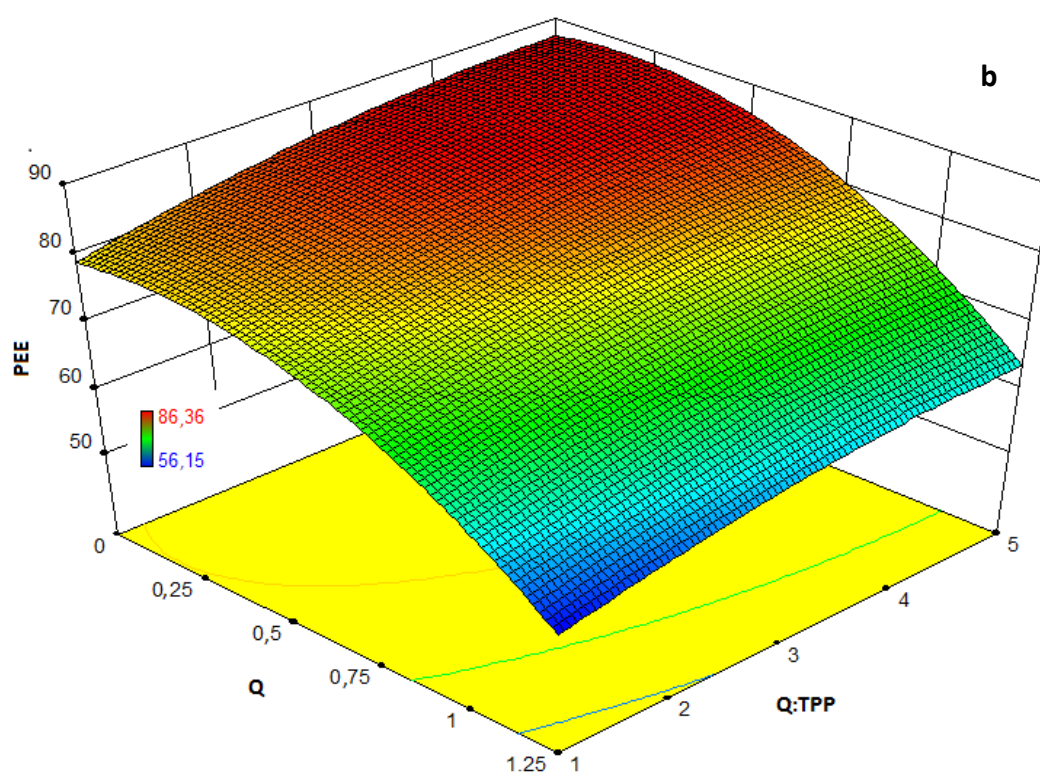
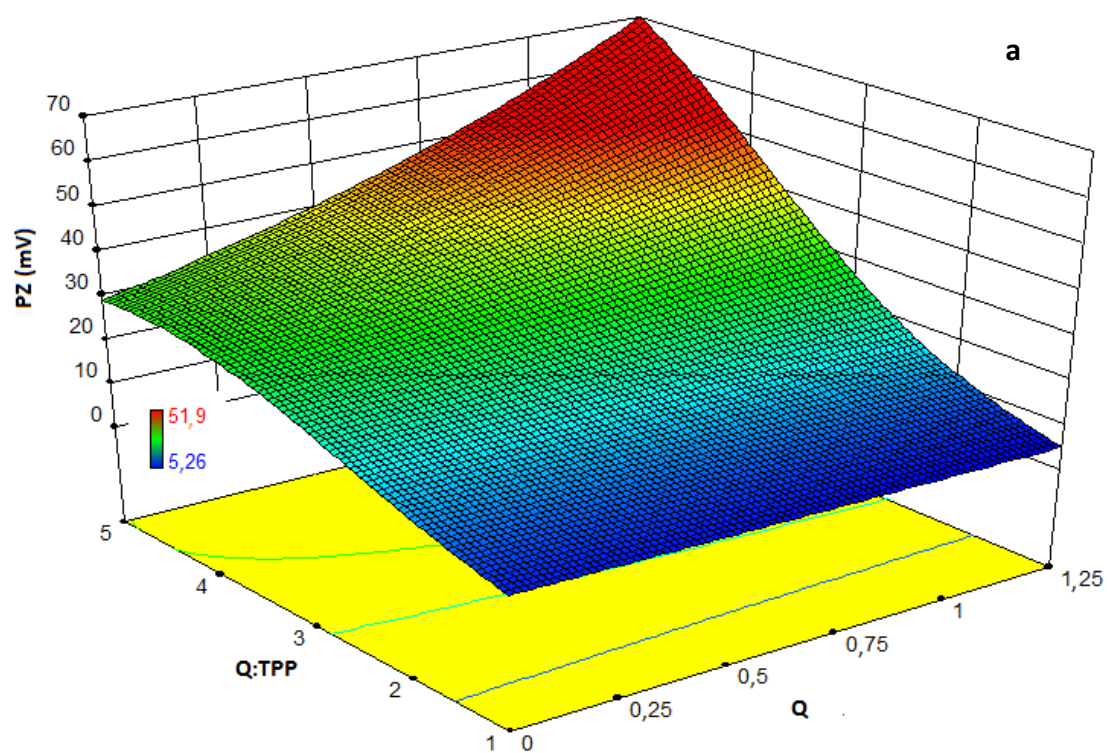
$$\begin{aligned} \text{Log}_{10}(\text{PZ}) = & 1,42 + 0,025 \times x_1 + 0,28 \times x_2 - 0,012 \times x_3 + 0,03 \times (x_1 \times x_2) - \\ & 0,070 \times x_2^2 - 0,019 \times x_3^2 \end{aligned} \quad [2.7]$$

$$\begin{aligned} \text{Log}_{10}(\text{PZ}) = & 0,37 - 0,020 \times \text{CH} - 0,45 \times \text{CH:TPP} + 2,61 \times 10^{-3} \times \text{GA} + \\ & 0,099 \times (\text{CH} \times \text{CH:TPP}) - 0,049 \times (\text{CH:TPP})^2 - 3,08 \times 10^{-5} \times (\text{GA})^2 \end{aligned} \quad [2.8]$$

De acuerdo con Ramadan y col. (2016), la determinación de PZ es una medida del espesor de la capa difusa. Cuanto mayor es el valor de PZ, mayor será el espesor de la capa difusa, siendo la dispersión más estable. Para compuestos con propiedades surfactantes de bajo peso molecular y estabilización puramente eléctrica, valores absolutos de PZ alrededor de 30 mV indican una buena estabilidad de la suspensión, en tanto que valores alrededor de 60 mV indican una excelente estabilidad (Honary y col., 2013; Mishra y col., 2009; Ramadan y col., 2016). Por otro lado, para agentes estabilizantes de alto peso molecular los cuales actúan

mayormente por estabilización estérica, valores de PZ de sólo 20 mV o mucho más bajos pueden proporcionar una estabilidad suficiente al sistema. Este comportamiento es atribuido a que las capas adsorbidas de agente estabilizante de alto peso molecular modifican el plano de cizalla a una distancia más lejana desde la superficie de la partícula, disminuyendo en consecuencia el valor de PZ (Ramadan y col., 2016). Otros autores también informaron valores similares de PZ trabajando con sistemas de nanopartículas a base de quitosano (Ramadan y col., 2016).

El PZ de la solución Q presentó un valor de +58 mV, el cual se asoció a las cargas positivas de los grupos amino protonados a pH ácido. El quitosano es un compuesto que combina la estabilización electrostática producto de su carga positiva con la estabilización estérica debido a su naturaleza polimérica. En el mismo sentido, el potencial zeta de las nanopartículas fue siempre positivo indicando la presencia de grupos amino del quitosano en la superficie (Jonassen y col., 2012). Como se muestra en la Figura 2.14 a, el PZ de las nanopartículas aumentó al incrementarse la relación Q:TPP, siendo esta tendencia más marcada cuando la concentración de Q fue mayor que 0,5% (Janardhanan y col., 2008). Los valores de PZ extremos fueron obtenidos como consecuencia de la interacción entre las variables (Q×Q:TPP).



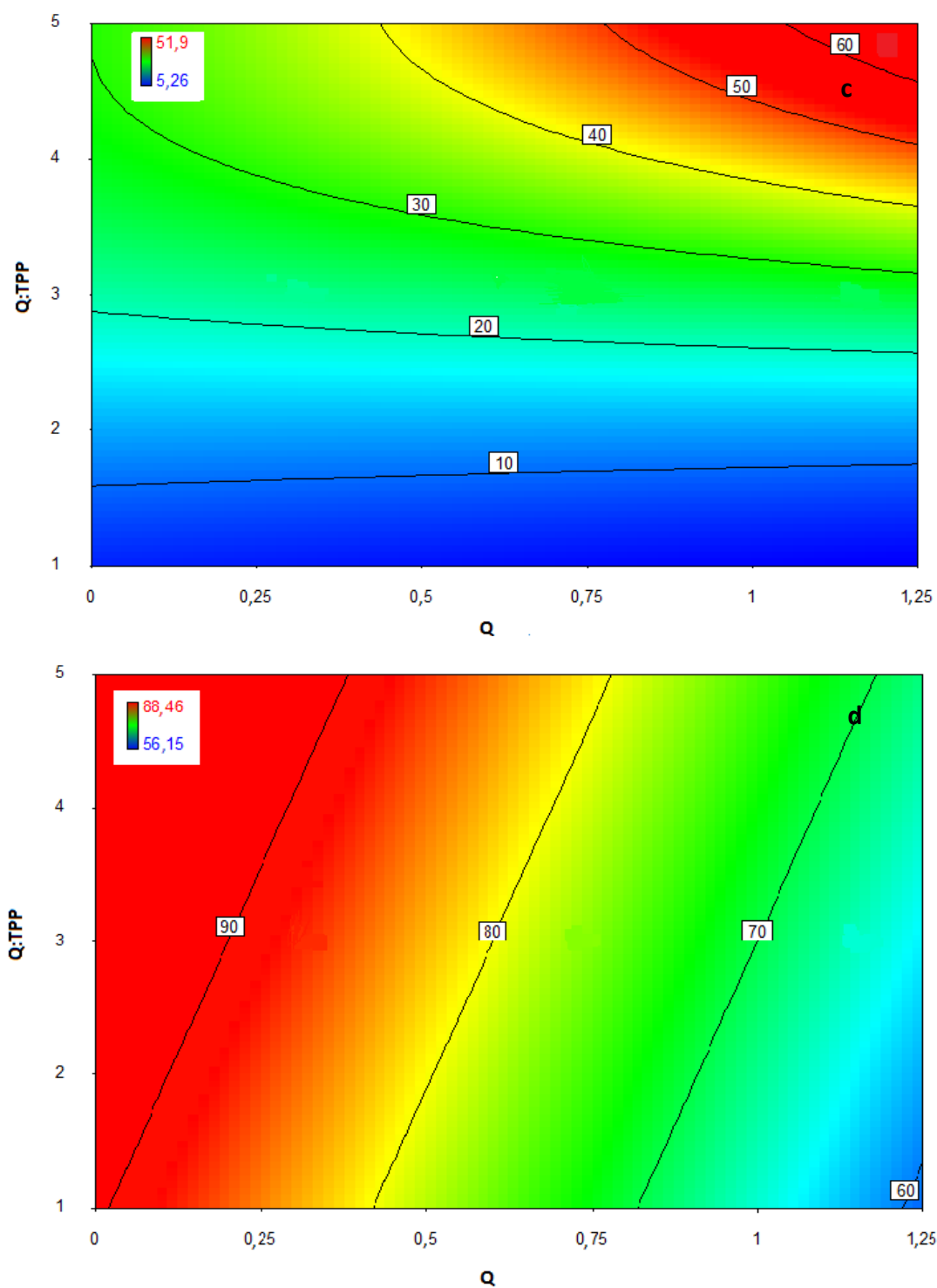


Figura 2.14. Superficie de respuesta de: **a)** potencial zeta (PZ) y **b)** porcentaje de eficiencia de encapsulación (PEE); gráficos de contorno de: **c)** PZ y **d)** PEE como una función de la concentración de quitosano y de la relación Q:TPP, expresado en valores codificados. La escala de colores se indica en cada Figura y las líneas corresponden a los valores isoparamétricos.

Las nanopartículas funcionalizadas con el compuesto activo presentaron valores de PZ bajos al aumentar la concentración de TPP debido a un efecto de neutralización de las cargas positivas. En contraste, no se observó una influencia significativa de la concentración de AG en los valores de PZ. Este hecho puede ser explicado considerando las bajas concentraciones de AG utilizadas.

Los puntos localizados en la línea de contorno correspondiente a PZ +30 mV fueron obtenidos con relaciones Q:TPP mayores que 3,5 independientemente de la concentración de Q (Figura 2.14 b). Mientras tanto, valores de PZ mayores que +40 mV fueron solamente obtenidos combinando relaciones de Q:TPP mayores que 4 con concentraciones de Q en el rango entre 0,5 y 1,25%. Los valores más bajos de la respuesta fueron obtenidos para relaciones de Q:TPP menores que 3 independientemente de la concentración de Q.

Por otro lado, considerando los datos de salida del porcentaje de eficiencia de encapsulación, la ecuación cuadrática también permitió un mejor ajuste, removiendo las interacciones no significativas (Q×Q:TPP) y (Q×AG).

Las expresiones obtenidas en términos de las variables codificadas y las actuales fueron las siguientes:

$$\begin{aligned} PEE = & 79,22 - 6,08 \times x_1 + 2,51 \times x_2 + 2,18 \times x_3 - 3,65 \times (x_2 \times x_3) - 1,35 \times x_1^2 - \\ & 0,69 \times x_2^2 - 3,0 \times x_3^2 \end{aligned} \quad [2.9]$$

$$\begin{aligned} PEE = & 39,84 + 8,14 \times CH + 11,16 \times CH:TPP + 0,93 \times GA - 0,12 \times (CH:TPP \times GA) - \\ & 21,64 \times (CH)^2 - 0,49 \times (CH:TPP)^2 - 0,49 \times 10^{-3} \times (GA)^2 \end{aligned} \quad [2.10]$$

Cuando la concentración de Q y la relación Q:TPP presentaron valores altos, se obtuvo el valor más elevado de PEE (Figura 2.14 b). Este resultado sugirió que el complejo de nanopartículas posee una estructura más compacta, con más grupos funcionales involucrados en la interacción polímero-compuesto activo. A pesar de que la interacción

Q:TPP×AG disminuyó el PEE, la concentración de AG no tuvo efecto alguno sobre esta respuesta.

Como puede observarse en la Figura 2.14 d, la línea de contorno de PEE correspondiente al 80 % fue obtenida con concentraciones de Q en el rango entre 0,5 y 0,75% (p/p) combinado con relaciones de Q:TPP de alrededor de 1,5 y 4, respectivamente. Cabe señalar que se obtuvo un PEE más alto que el 85% cuando la concentración de Q no excedió el 0,6% p/v y la relación Q:TPP mayor que 4. Esto indicaría que el proceso de encapsulación es fuertemente dependiente de la carga positiva del agente encapsulante, es decir, del quitosano. Resultados similares fueron encontrados por Deng y col. (2006) quienes encapsularon lizosimas en nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP informando que en el intervalo de concentraciones de 0,5-1,5% p/v de quitosano se puso en evidencia un aumento en la eficiencia de encapsulación con el aumento de la concentración de quitosano.

Luego de hacer la regresión de cada modelo predictivo, se llevó a cabo un análisis de residuos para validar las suposiciones usadas. El análisis de residuos es un método para corroborar la adecuación del modelo. La comprobación de la hipótesis de normalidad se realizó mediante la construcción de un gráfico de probabilidad normal de los residuos, como se muestra en la Figura 2.15 a y b.

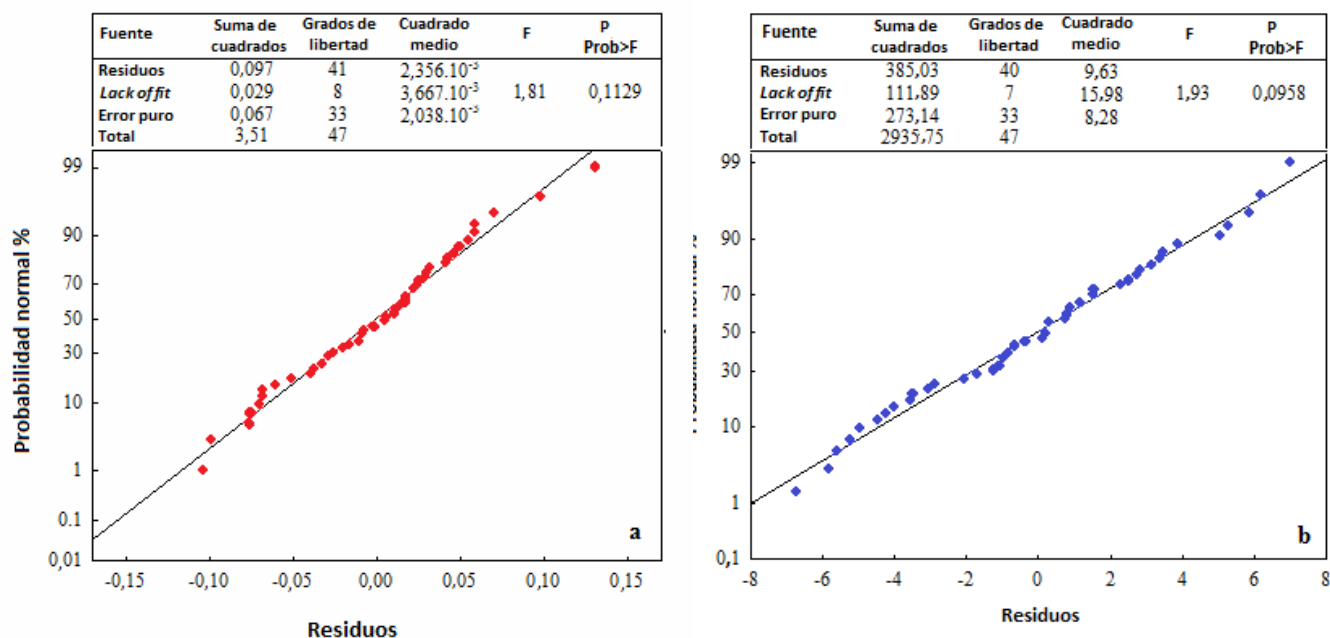


Figura 2.15. Gráfico de probabilidad normal de los residuos: **a)** potencial zeta (PZ) y **b)** porcentaje de eficiencia de encapsulación (PEE).

La distribución de los residuos alrededor de una línea recta tanto para PZ como para PEE indicaron que la normalidad fue satisfactoria. Esto significa que la confianza para el ajuste de las ecuaciones de regresión para los valores observados fue superior al 95% para todas las respuestas. Adicionalmente, el patrón de dispersión al azar de los residuos en función de la respuesta predicha, indicó que los modelos empleados fueron adecuados y no se comprobó ninguna violación de la independencia y la suposición de varianza constante (Lee y col., 2015).

Como se detalló anteriormente, el ensayo de prueba de falta de ajuste predice si el modelo seleccionado representa adecuadamente los datos experimentales mediante la variación de los datos alrededor del modelo. Asimismo, una falta de ajuste no significativa pone en evidencia la previsibilidad del modelo. Como se muestra en la Tabla inserta en la Figura 2.15 a, la prueba de falta de ajuste para PZ no fue significativa ($p > 0,05$) confirmando que el modelo seleccionado resultó ser adecuado para los datos experimentales. La suma de

cuadrados de los residuos combina el componente del error puro derivado de los replicados de las corridas en el centro y el componente de falta de ajuste formado por la agrupación de todos los pequeños efectos y las interacciones removidas.

La relación entre los datos predichos y los experimentales fue satisfactoria, con un R^2 de 0,968 y un R^2_{adj} de 0,965 indicando que el modelo ajustado explicó el 96,5% de la varianza de PZ. Asimismo, la diferencia entre R^2_{adj} y R^2_{pred} (0,958) fue menor que 0,007 lo que indicaría una buena concordancia entre ambos. Considerando el análisis del PEE, la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) (Tabla inserta en la Figura 2.15 b). Por lo tanto, el modelo se ajustó a los datos experimentales, presentando un valor de R^2 de 0,869 y $R^2_{adj} = 0,846$, logrando un ajuste razonable con $R^2_{pred} = 0,811$.

Al mismo tiempo, se obtuvieron valores de coeficientes de variación relativamente bajos ($CV_{PZ} = 3,61$ and $CV_{PEE} = 4,14$) indicando buena precisión y confiabilidad de los datos experimentales. Estos resultados se correspondieron con los informados por Amini y col. (2008).

En resumen, los modelos de regresión pueden ser usados para predecir respuestas en cualquier punto del espacio explorado por los factores del diseño.

2.3.3 Deseabilidad global

El modelado de una respuesta o una función de variables de un diseño implican encontrar áreas donde el proceso es probable que proporcione resultados deseables. En muchos casos, el termino deseabilidad es una función de múltiples respuestas. Derringer y Suich (1980) informaron que la aproximación general consiste en convertir cada respuesta y_i dentro de una función deseabilidad individual d_i que varía en el rango

$$0 \leq d_i \leq 1 \quad [2.11]$$

con, $d_i=0$ representando la indeseabilidad completa de y_i y $d_i=1$ la deseabilidad completa o valor ideal de la respuesta. El modelo matemático para encontrar la deseabilidad global, D ,

es la media geométrica de los valores de deseabilidad individuales (Derringer y Suich 1980), lo cual se puede expresar como:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m} \quad [2.12]$$

donde hay m respuestas.

Esta transformación hace que sea posible combinar los resultados obtenidos para propiedades medidas en diferentes órdenes de magnitud. Por lo tanto, la optimización simultánea es utilizada para encontrar los niveles de los factores que demuestren la máxima deseabilidad promedio (Bezerra y col., 2008). Una vez obtenidas las ecuaciones predictivas individuales (Ec. 2.8 y 2.10), se definieron dos funciones de deseabilidad para las variables que fueron significativamente afectadas por la formulación, esto es, potencial zeta y porcentaje de eficiencia de encapsulación, donde ambas respuestas fueron maximizadas.

La metodología de deseabilidad global promedio fue utilizada para encontrar la formulación óptima que incluyó 0,76% de Q, relación Q:TPP de 5, y 37 mg_{AG}/g_Q dando valores de +50mV para PZ y 82% para PEE. El valor obtenido de D resultó ser de 0,934 indicando que la función estimada fue capaz de representar el modelo experimental y las condiciones deseadas.

2.3.4 Caracterización óptica

Se utilizó la técnica de QuickScan para detectar posibles fenómenos de desestabilización proporcionando así una medida precisa y cualitativa de la estabilidad de las suspensiones de nanopartículas de quitosano obtenidas. Como es sabido, el fenómeno que involucra una variación significativa de la transmisión en la parte superior y en la inferior del espectro indica un mecanismo de desestabilización por agregación (asociado con clarificación, sedimentación o cremado), mientras que variaciones en la zona media están relacionadas con el tamaño de partícula (Carbone y col., 2014).

Lorenzo y col. (2015) señalaron que este método permite identificar, en un estadio temprano, diferentes cambios estructurales que inducen la desestabilización del sistema los cuales resultan detectables a simple vista después de un tiempo mensurable.

Las Figuras 2.16 a y b muestran los perfiles de transmitancia de las formulaciones N₉-N₁₅. A pesar de que la forma de las curvas de N₁₁, N₁₅ y N₁₂ resultaron cualitativamente similares ellas difirieron una de otra respecto al valor máximo de transmitancia y de turbidez medidos (Figura 2.16 a). Estos valores (0,01, 0,21 y 0,51) estuvieron vinculados a la relación Q:TPP (1, 3 y 5, respectivamente) debido a que estas suspensiones fueron preparadas con la misma concentración de Q y de AG (0,75 % y 50 mg_{AG}/g_Q).

Por otra parte, una alta relación de Q:TPP combinada con la más baja concentración de Q llevó a la máxima proporción de Q libre, obteniéndose suspensiones prácticamente transparentes que exhibieron altos valores de transmitancia (N₃, N₄ y N₉) (Figuras 2.17 b y 2.16 b, respectivamente). Por otra parte, la transmitancia se redujo a valores cercanos a cero cuando la relación Q:TPP disminuyó a 1 y 1,81 y simultáneamente la concentración de Q aumentó hasta 0,75% p/v (N₅, N₆ y N₁₁) (Figura 2.16 a y Figura 2.17 b). Caddeo y col. (2016) explicaron que este hecho pone en evidencia la importancia del quitosano en la organización estructural de los nanosistemas, traduciéndose en una mejora de la estabilidad.

Como se describió previamente, el potencial zeta es una herramienta útil para predecir la estabilidad del sistema por repulsión electrostática. Cuando las partículas tienen un alto valor positivo o negativo de potencial zeta, ellas permanecen separadas una de otras y la suspensión es estable como en el caso de N₁₂ cuyo valor de PZ fue de +46,6 mV.

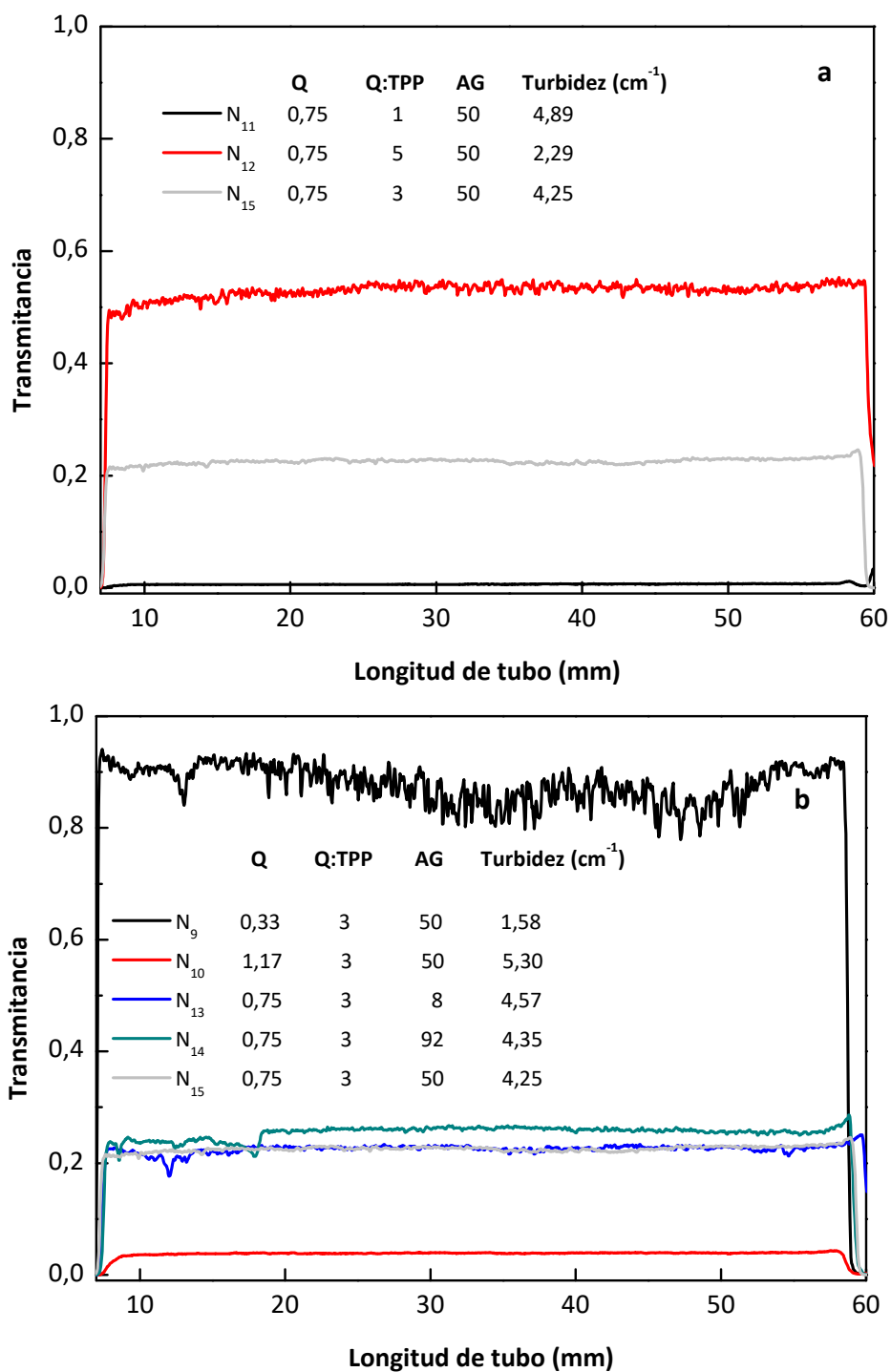


Figura 2.16. Perfiles de transmitancia obtenidas por QuickScan de las suspensiones: **a)** N₁₁, N₁₂ y N₁₅ formuladas con 0,75 % de Q, 50 mg AG/g Q y relaciones Q:TPP de 1, 3 y 5 respectivamente; **b)** N₉, N₁₀, N₁₃, N₁₄ y N₁₅ preparadas con una relación Q:TPP constante de 3.

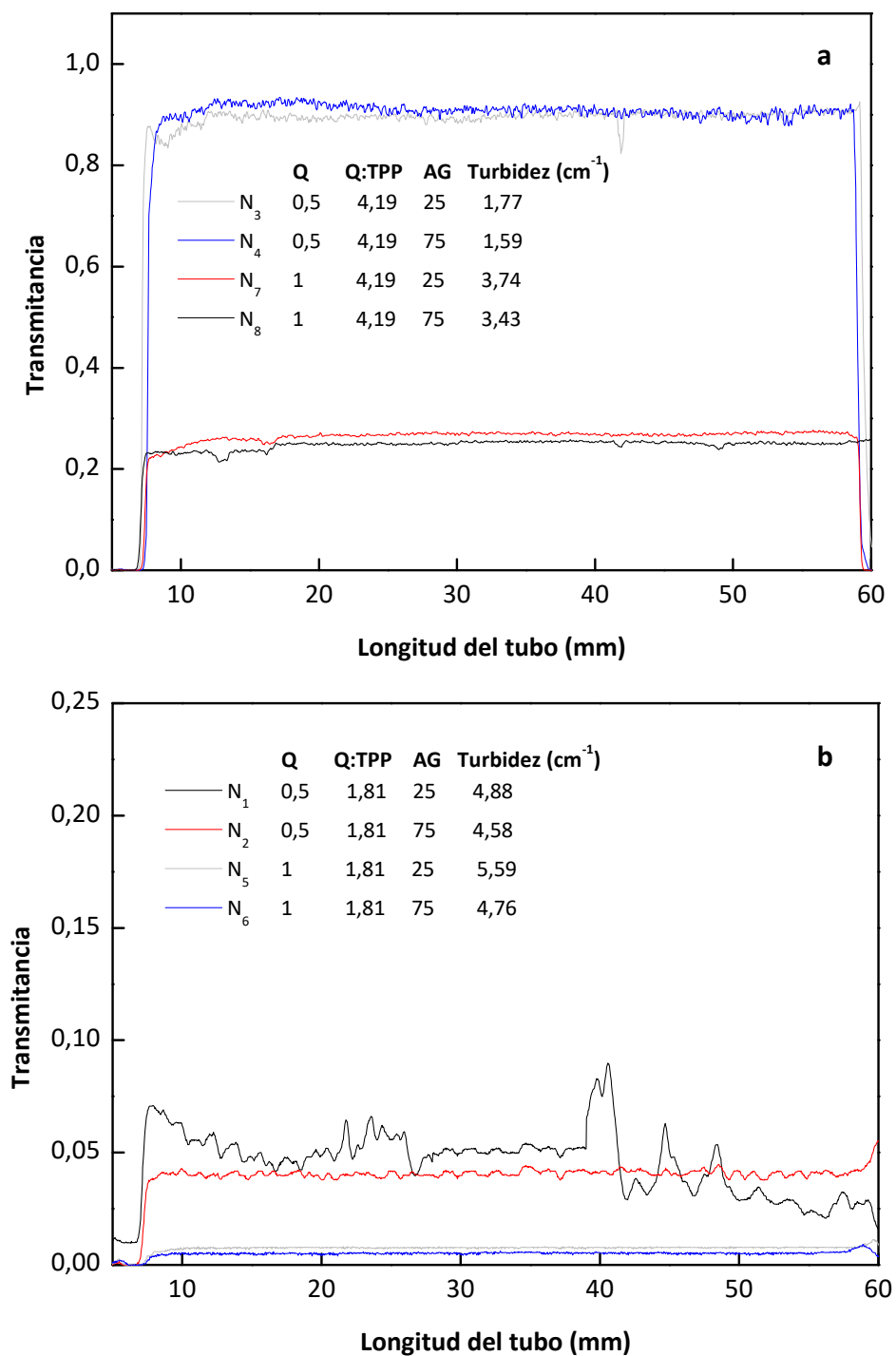


Figura 2.17. Perfiles de transmitancia obtenidas por QuickScan de las suspensiones: **a)** N_3 , N_4 , N_7 y N_8 formuladas con una relación Q:TPP de 4,19 y **b)** N_1 , N_2 , N_5 y N_6 preparadas con una relación Q:TPP de 1,81

Como se puede observar en la Figura 2.16 b las muestras N₁₃, N₁₄ y N₁₅ se diferenciaron únicamente en el contenido de AG (8, 92 y 50 mg AG/g Q, respectivamente), presentando valores similares de transmitancia de aproximadamente 0,22. Este hecho indicaría que el compuesto activo incorporado (AG) prácticamente no tuvo influencia en los parámetros de diseño de partículas, de acuerdo con los resultados obtenidos por las respuestas de PZ y PEE.

Cuando las partículas exhibieron bajos valores de PZ como la formulación N₁₁ (+5,3 mV en promedio) así como N₅ y N₆ (~+10 mV, Figura 2.17 b) las fuerzas repulsivas fueron pequeñas y las partículas se agregaron, resultando en una inestabilidad de la suspensión. Por lo tanto, se puede inferir que tanto la concentración de Q como la de TPP podrían alterar críticamente la estabilidad de las suspensiones a través de la modificación de la carga superficial del sistema.

Adicionalmente, comparando las muestras N₉, N₁₅ y N₁₀ (Figura 2.16 b) con relaciones Q:TPP equivalentes (igual a 3) y con la misma cantidad de AG (50 mg AG/g Q), la mayor concentración de Q (0,3, 0,75 y 1,17%, respectivamente) condujo al valor más bajo de transmitancia y por lo tanto a un elevado valor de turbidez.

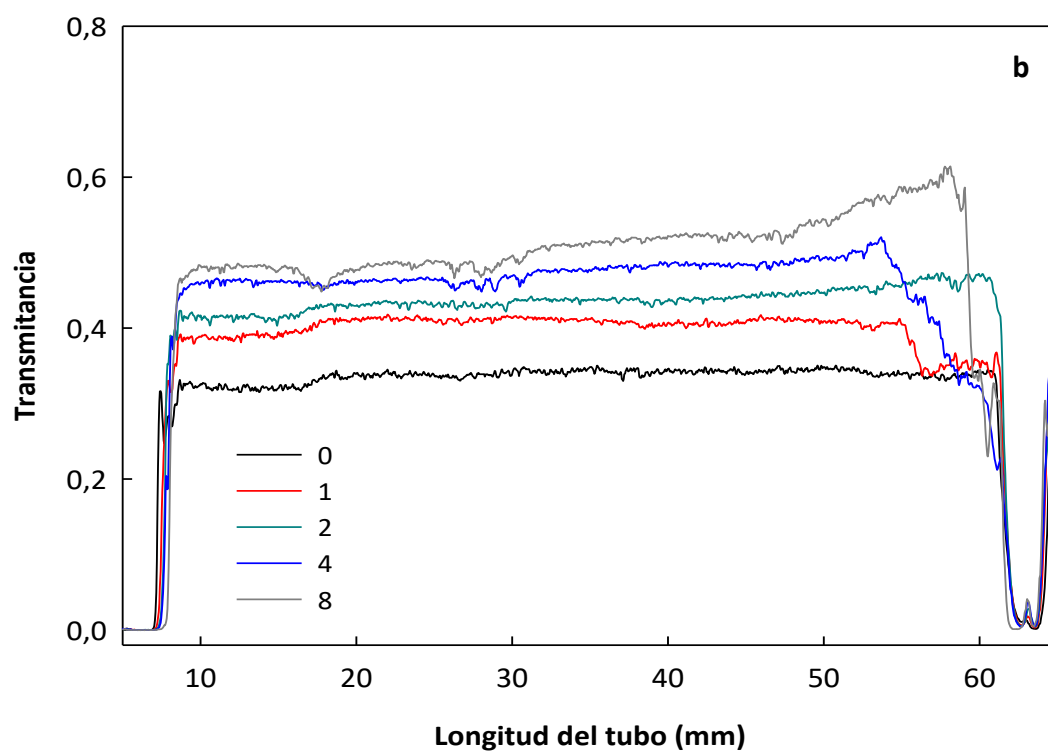
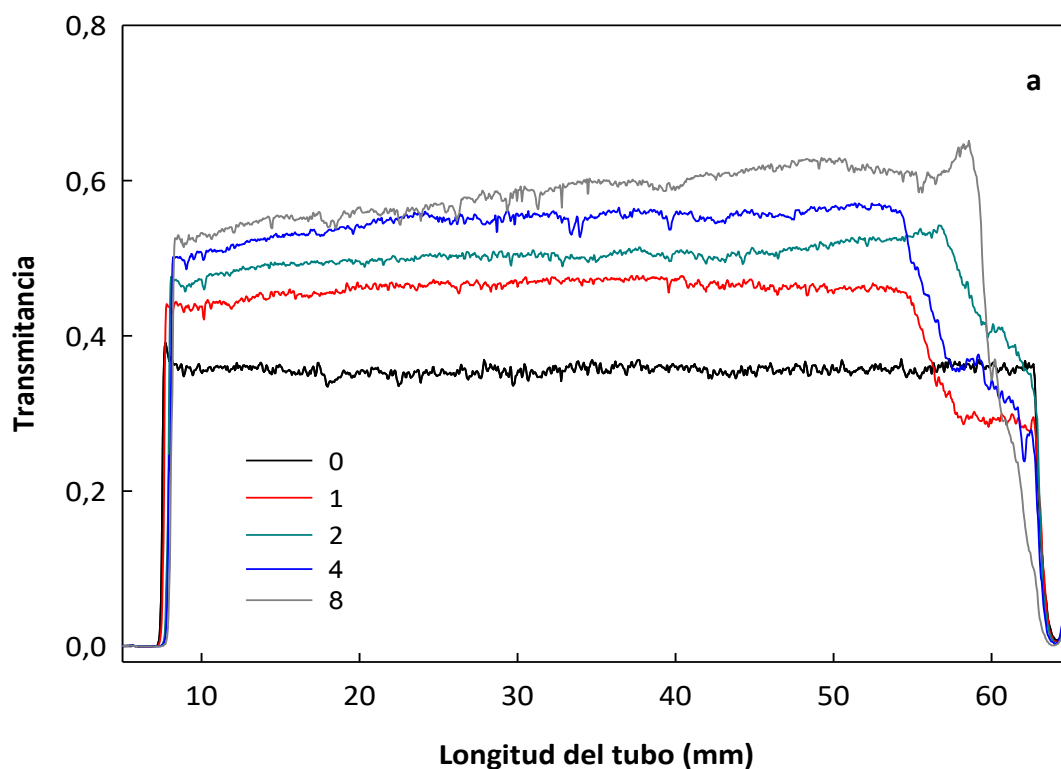
De esta manera se podría establecer una relación inversa entre la turbidez obtenida por la ecuación (2.4) y los valores de transmitancia medidos por QuickScan y de PZ.

Se seleccionaron dos formulaciones en base a la optimización realizada y a estudios de transmitancia (N₁₂ y N₁₅) para profundizar algunos estudios de estabilidad en función del tiempo (8 días). Asimismo, a fin de establecer el papel desempeñado por AG en el fortalecimiento de la estabilidad global del sistema, estas suspensiones se estudiaron sin el agregado del compuesto activo para confirmar o descartar la predicción del modelo que no pudo establecer la influencia del ácido gálico sobre esta la estabilidad. Otro parámetro relevante a incorporar a este análisis fue el efecto del tamaño de partícula de las formulaciones seleccionadas.

Siguiendo el criterio mencionado, se seleccionó la formulación próxima al valor de deseabilidad global previamente estimado. En este sentido, se escogió la suspensión N₁₂

Capítulo 2: Nanopartículas a base de quitosano

(0,75% de Q, relación Q:TPP de 5, y 50 mg AG/g Q) cuyo tamaño de partícula fue de 458 nm, y para realizar el estudio comparativo la formulación N₁₅ (0,75% de Q, relación Q:TPP de 3, y 50 mg AG/g Q) considerando que estos dos sistemas sólo diferían en la relación Q:TPP.



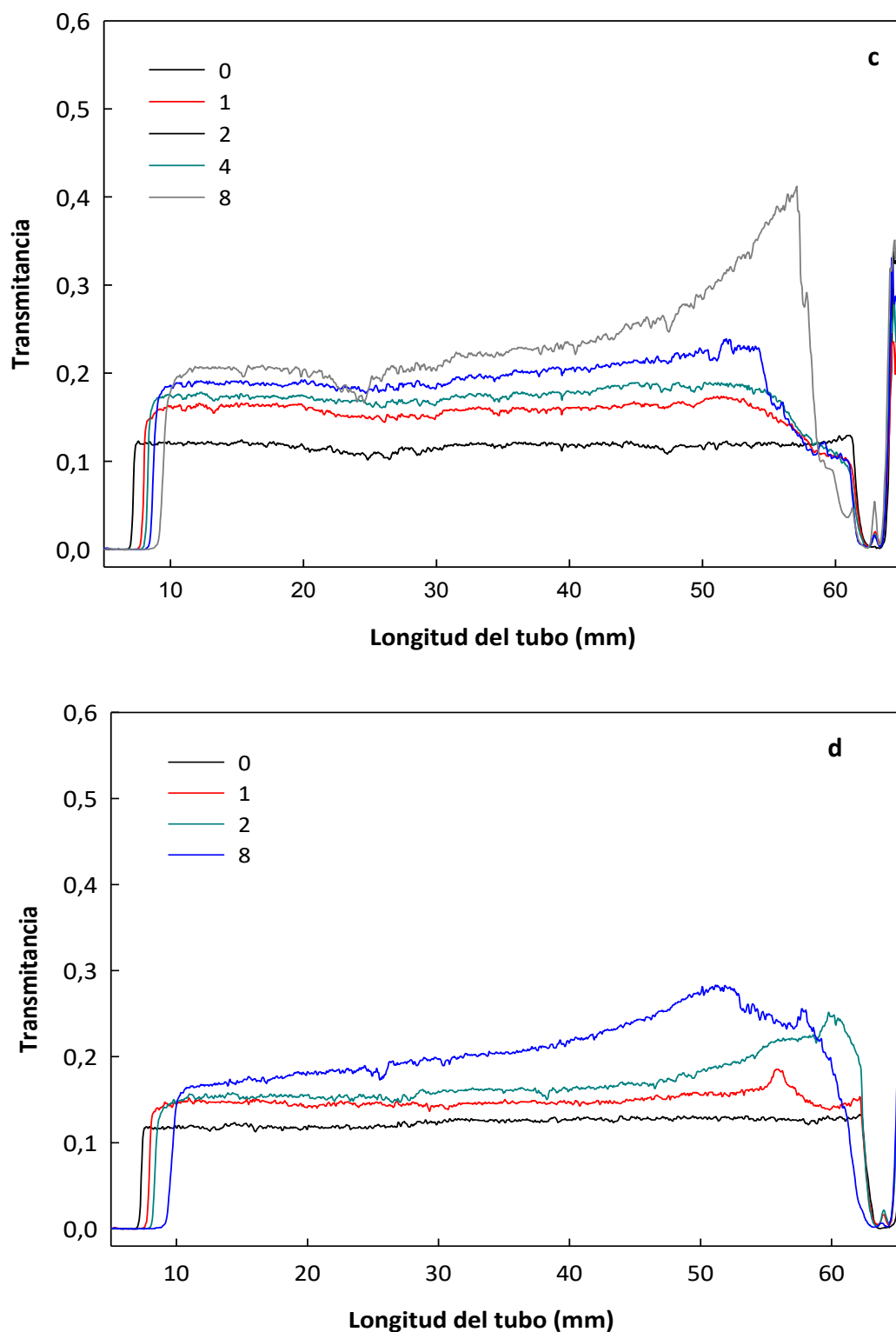


Figura 2.18 Evolución de los perfiles de transmitancia en función del tiempo de almacenamiento (días) de las formulaciones: **a)** N₁₂ vacía; **b)** N₁₂; **c)** N₁₅ vacía; **d)** N₁₅.

La Figura 2.18 muestra los perfiles obtenidos en función del tiempo de suspensiones almacenadas durante 8 días a temperatura ambiente. Como puede observarse, las muestras preparadas sin AG produjeron suspensiones más transparentes con un valor de transmisión ligeramente más alto en relación a las formulaciones funcionalizadas con el compuesto activo.

Según Alonso y col. (2015), el AG puede actuar como un agente surfactante no iónico. Su efectividad como tensoactivo se encuentra en el rango de otros compuestos no iónicos comerciales aumentando el área superficial de las nanopartículas. Esta explicación se correlacionó con los menores valores de transmitancia obtenidos (Figura 2.18 b y d). Si bien las suspensiones seleccionadas demostraron ser estables, es importante resaltar que la N₁₂ con mayor relación Q:TPP en comparación a N₁₅ y mayor el tamaño de nanopartículas exhibió un valor más alto de transmitancia (Figura 2.18). Resultados similares fueron informados por Kim y col. (2008) quienes encontraron que la transmisión de dispersiones de nanotubos de carbono con agentes surfactantes fue muy baja y se mantuvo casi constante. Mientras tanto, los valores de transmitancia de la dispersión sin el agregado de AG sufrieron un ligero aumento, lo que podría estar relacionado con la ocurrencia de fenómenos de agregación. Además, las suspensiones acuosas con AG exhibieron mayor estabilidad que las que no tenían agente tensoactivo en la formulación.

Según Mengual y col. (1999), el proceso que describe y explica este fenómeno se produce como consecuencia de la sedimentación de las partículas en el fondo del tubo de medida. Los valores de PZ de las formulaciones N₁₂ y N₁₅ sin presencia de ácido gálico fueron de +50,7 y +30,6 mV, respectivamente

Como se observa en la fotografía de las suspensiones N₁₂ y N₁₅, los tubos correspondientes a las formulaciones N₁₅ exhibieron una mayor turbidez, relacionada con el menor tamaño de las partículas (Figura 2.19).

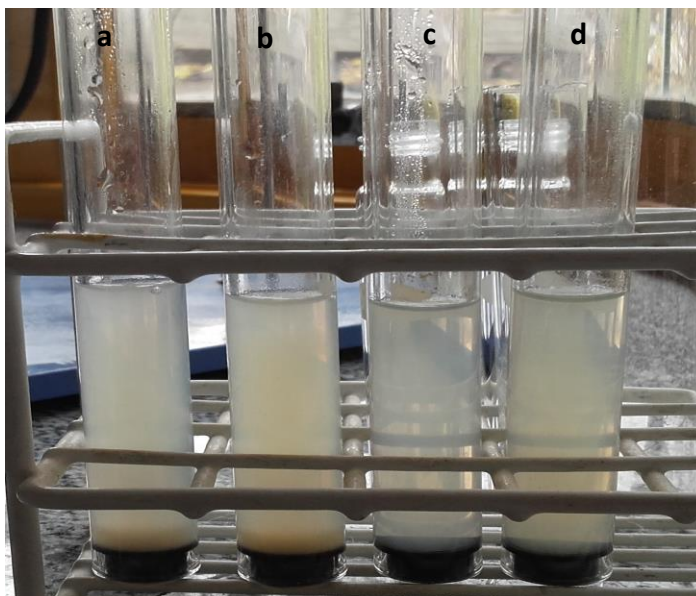


Figura 2.19. Fotografías de suspensiones de nanopartículas cargadas con compuesto activo y vacías luego de 8 días de almacenamiento a 20°C: **a)** N₁₅ vacía; **b)** N₁₅; **c)** N₁₂ vacía; **d)** N₁₂.

2.3.5 Análisis del diámetro de partícula

La gelificación iónica del quitosano en contacto con polianiones se basa en la formación de entrecruzamientos inter e intramoleculares mediados por estos contraiones. Como se puede observar en el esquema presentado la Figura 2.12, las nanopartículas de Q se obtuvieron como consecuencia de las uniones moleculares establecidas entre los grupos fosfatos del TPP y los grupos amino del Q. La Figura 2.20 muestra que los diámetros de partículas más pequeños (entre 140 y 180 nm en promedio) fueron obtenidos para las formulaciones N₉, N₁₀, N₁₃, N₁₄ y N₁₅ las cuales tuvieron en común una relación de Q:TPP igual a 3. Estas suspensiones se mantuvieron estables tal como se evidenció en las medidas realizadas a través del QuickScan, pero difirieron en los valores de transmitancia los cuales fueron 0,92, 0,04, 0,21, 0,22 y 0,21, respectivamente y con valores de PZ en el rango entre +22 y +30 mV.

Por otra parte, los tamaños de partículas para las formulaciones N₁, N₂, N₅, N₆ y N₁₁ resultaron mayores que 700 nm. Simultáneamente, los valores más bajos de transmitancia se obtuvieron para estas formulaciones preparadas por la incorporación de altas

concentraciones de TPP dando bajas relaciones Q:TPP (1,81 y 1). La presencia de altas concentraciones de TPP en los sistemas resultó en partículas con mayor diámetro hidrodinámico. Similares resultados fueron encontrados por Katas y col. (2013) estableciendo una dependencia de la relación Q:sulfato de dextrano. Los autores remarcaron que controlando esta relación es posible obtener nanopartículas con propiedades deseadas ajustando la densidad de carga superficial a fin de facilitar la adherencia y la vehiculización del compuesto activo.

Fue posible inferir que bajos valores de transmitancia podrían ser obtenidos como consecuencia de la formación de partículas de gran tamaño como se describió anteriormente, o debido a la presencia de una cantidad significativa de Q que permanece libre en la suspensión como en el caso de N₁₀.

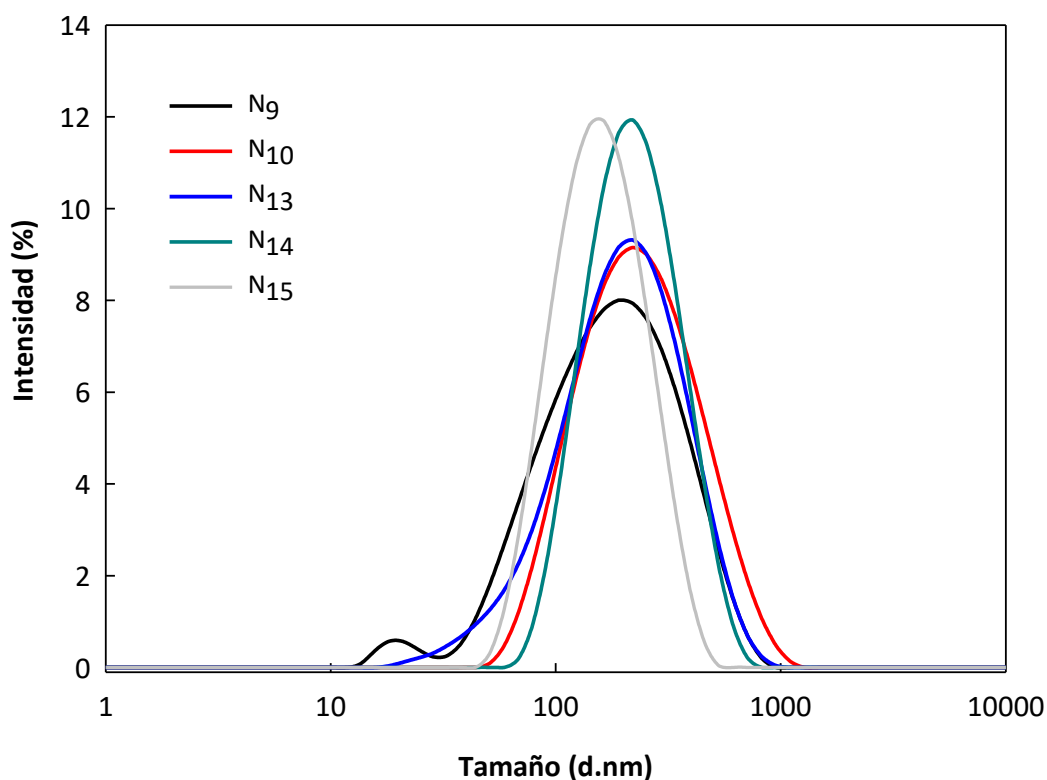


Figura 2.20. Perfiles de distribución de tamaño de nanopartículas (N₉, N₁₀, N₁₃, N₁₄ y N₁₅) para formulaciones con una relación Q:TPP igual a 3.

Cabe señalar que la concentración más alta de Q y la relación Q:TPP baja llevaron a la inestabilidad del sistema, con la consecuente formación de partículas más grandes consistentes con los bajos valores de potencial zeta. Estos resultados se atribuyeron a las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de las cadenas poliméricas del quitosano y el exceso de carga negativa del TPP formando una superficie con menor densidad de carga positiva.

Asimismo, los valores obtenidos de IPD se correlacionaron principalmente con los diámetros de tamaño de partícula. Esto es, valores de IPD más bajos que 0,3, observados para suspensiones relativamente monodispersas, se correspondieron con tamaños cercanos a 160 nm en promedio y sistemas estables. Mientras tanto, valores mayores que 0,5 fueron asociados con sistemas inestables y diámetros grandes de nanopartículas.

A partir de la distribución de tamaño de partículas de las suspensiones estudiadas, en la formulación N₁₂ vacía se determinó que el diámetro hidrodinámico de las cápsulas fue de 294 nm (± 32), significativamente menor ($p < 0,05$) que el de la formulación N₁₂ cargada con ácido gálico (458 nm). Este resultado fue similar al encontrado por Papadimitriou y col. (2008), quienes desarrollaron nanopartículas de quitosano cargadas con dorzolamida y pramipexole. Los autores señalaron que las nanopartículas cargadas mostraron un aumento significativo en el radio hidrodinámico en relación a las partículas vacías y atribuyeron este fenómeno a las interacciones establecidas entre el compuesto activo y el quitosano.

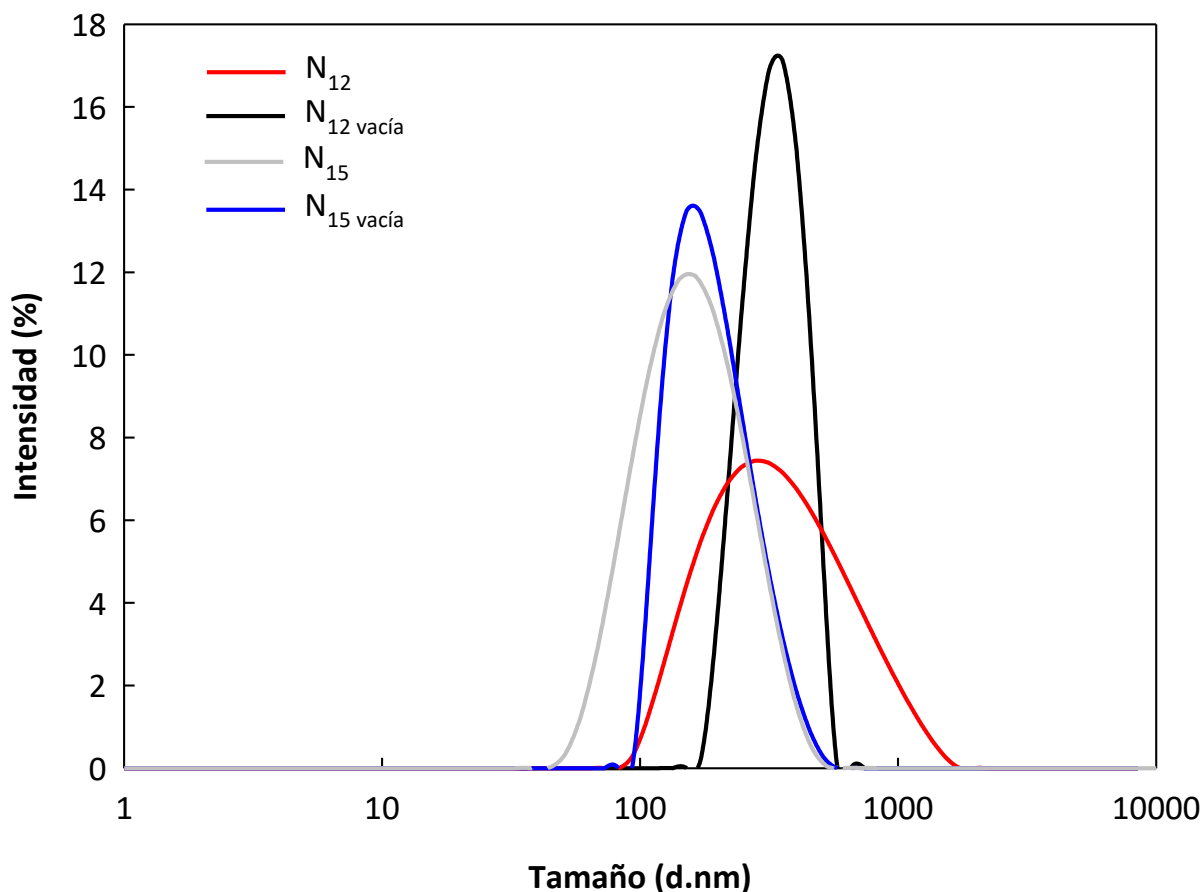


Figura 2.21. Perfiles de distribución de tamaño de nanopartículas cargadas con AG y vacías (N_{12} , N_{15} , N_{12} o 15 vacías) formuladas con una relación Q:TPP de 5 o 3, respectivamente.

Por otra parte, las observaciones por TEM permitieron examinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas de quitosano (Figura 2.22). La morfología es un factor importante que determina la estabilidad coloidal y química. El análisis microscópico reveló el tamaño nanométrico de las formulaciones N_{12} , N_{15} , y las suspensiones sin AG (N_{12} o 15 vacías) e indicó que la forma de las nanopartículas fue aproximadamente esférica.

Como puede observarse en la Figura 2.22, las nanopartículas se encuentran embebidas en quitosano presentando un contorno de polímero y TPP sin reaccionar; este resultado fue similar al observado por Bugnicourt y col. (2014) quienes identificaron la presencia de

quitosano al examinar las nanopartículas por TEM y atribuyeron estos resultados a un proceso de lavado de las partículas y a las propiedades muadhesivas del polímero.

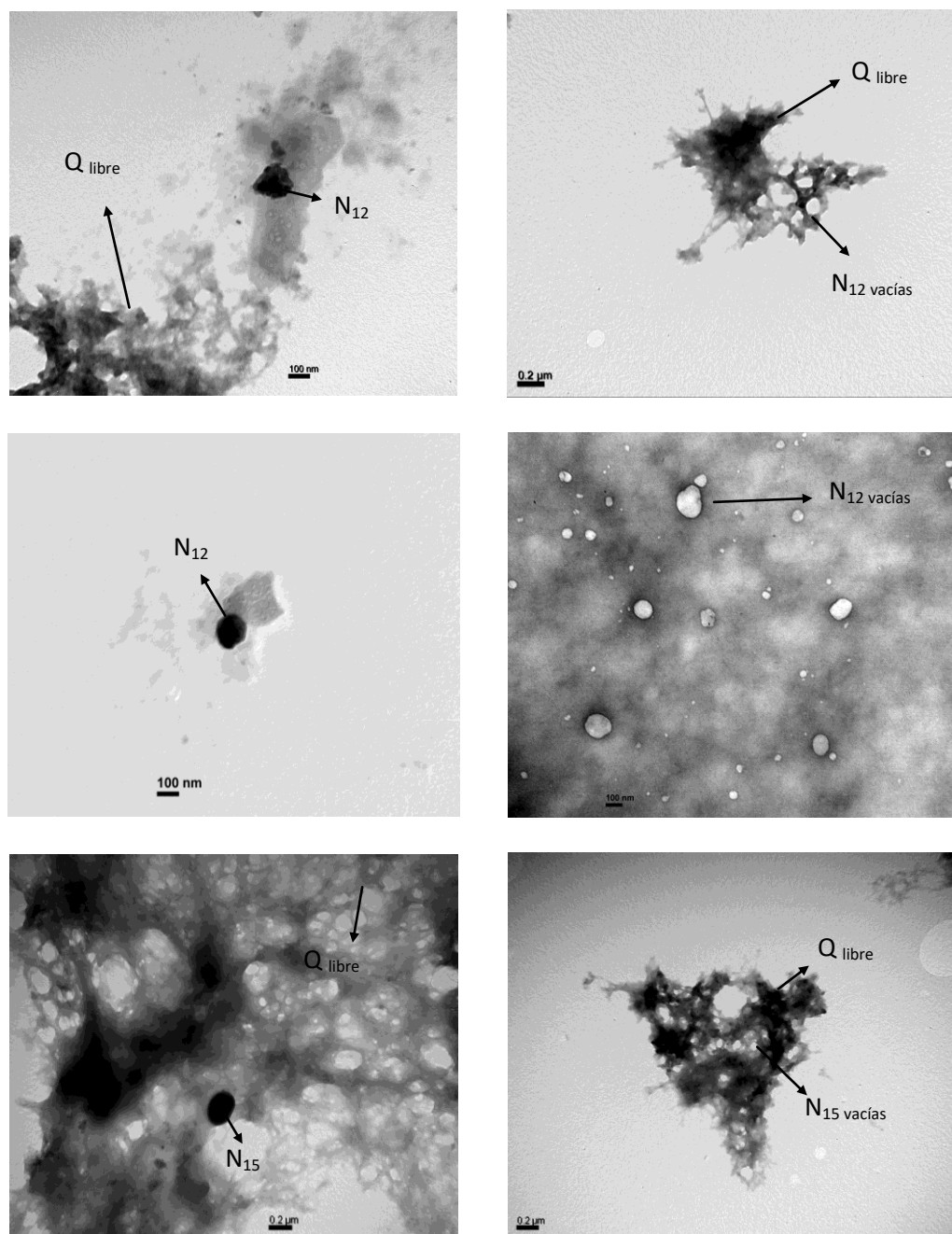


Figura 2.22 Micrografías obtenidas por TEM de las suspensiones de nanopartículas: N₁₂, N₁₅, N₁₂ vacía, N₁₅ vacía.

En resumen, los sistemas más estables resultaron ser los formulados con relaciones Q:TPP igual a 3 y concentraciones de Q de aproximadamente 0,75%, cuyos valores de PZ oscilaron entre +22 y +30 mV. Este comportamiento se correlacionó con bajos diámetros de partícula y IPD menores a 0,3. Teniendo en cuenta estos resultados y los anteriormente mencionados acerca de PZ en la *sección Metodología de superficie de respuesta*, se pudo inferir que la estabilidad del sistema no solo depende de los valores de PZ sino también, y principalmente, de la relación Q:TPP.

2.3.6 Análisis mediante FTIR

Los estudios realizados por FTIR revelaron las interacciones químicas establecidas entre los componentes que conforman las nanoestructuras. El mecanismo de gelificación ionotrópica que permite la formación de las nanopartículas de quitosano funcionalizadas con ácido gálico se examinó mediante FTIR. Para investigar las interacciones involucradas en la formación de las nanopartículas, se obtuvieron películas por la metodología de moldeo y deshidratación de Q, QAG y de las formulaciones de nanopartículas N₁₂, N₁₅, así como las partículas N₁₂ o N₁₅ vacías tal como se describió en la *sección 2.2.5*.

La Figura 2.23 a y b describe los espectros de FTIR de las suspensiones de nanopartículas de Q (N₁₂ y N₁₅), y de las soluciones de Q y QAG moldeadas. El espectro de Q exhibe las bandas características a 1644 cm⁻¹ (estiramiento del C=O en el grupo amida, vibración de la amida I), 1562 cm⁻¹ (torsión del grupo -NH₂ de la 2 amino-glucosa) y 1381 cm⁻¹ (estiramiento del grupo -C-O de alcoholes primarios) (Figura 2.23 a). Se observó un pico de absorción a 1165 cm⁻¹ (estiramiento antisimétrico de los -C-O-C glicosídicos unidos entre las unidades monoméricas de quitosano) y una banda a 1033 cm⁻¹ (vibración que engloba el estiramiento del -C-O) típicos de las estructuras de sacáridos (Rivero y col., 2010).

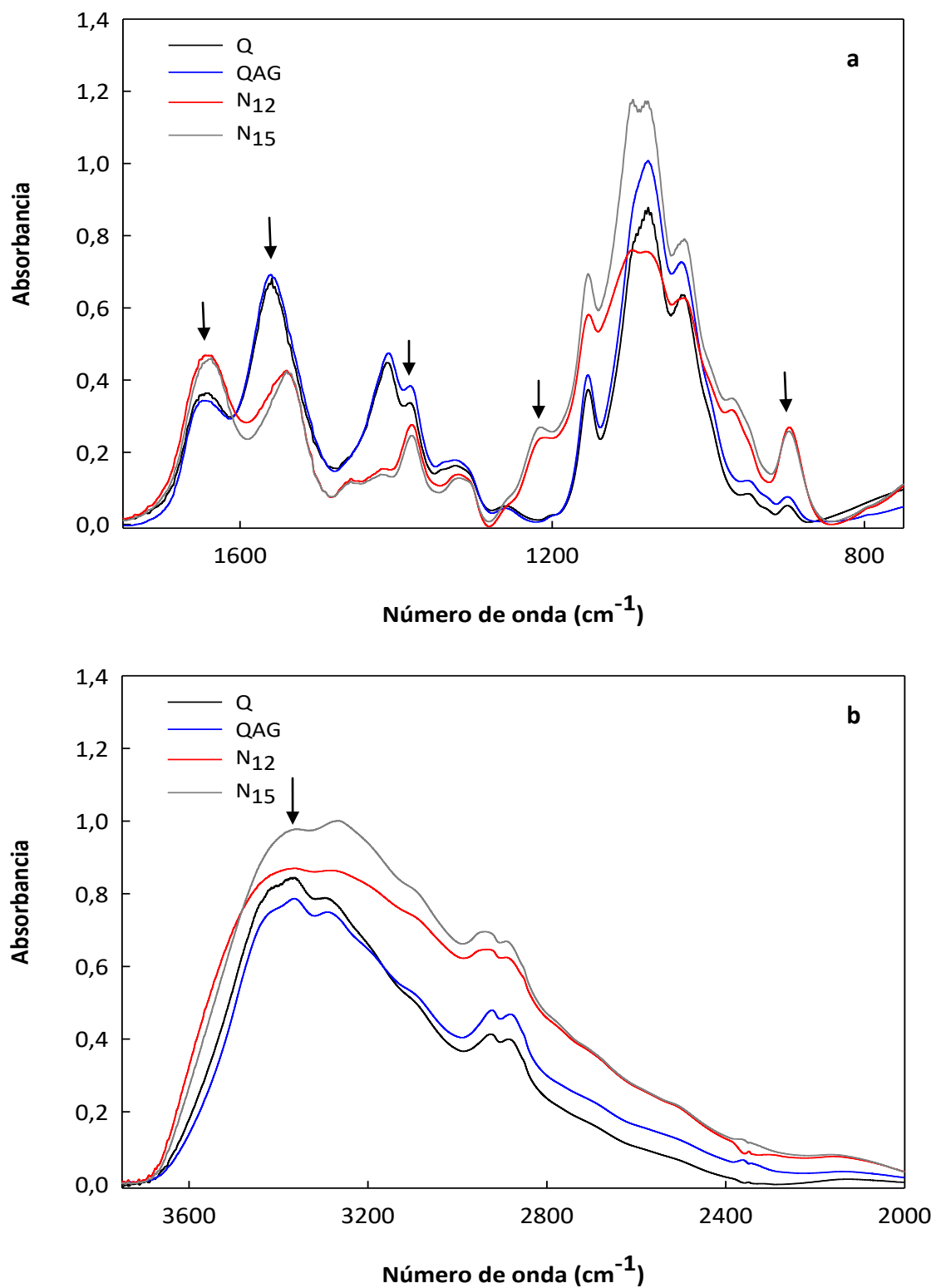


Figura 2.23. Espectros FTIR de Q, QAG y nanopartículas funcionalizadas con AG en las regiones de longitudes de onda comprendidas entre: **a)** 1750-750 cm⁻¹ y **b)** 3800-2000 cm⁻¹

La presencia de AG prácticamente no modificó el espectro de Q, señal de que la interacción entre el Q y el compuesto activo fue de tipo física (Akakuru y Isiuku, 2017) (Fig. 2.23 a). Por otro lado, los espectros de las suspensiones de nanopartículas (N_{12} y N_{15}) incluyendo Q, AG y el agente reticulante TPP, revelaron marcadas diferencias con respecto a los espectros de Q y QAG (Figura 2.23 a y b).

El espectro de TPP presentó bandas de absorción a 1211, 1158, 1097 y 898 cm^{-1} que se atribuyeron al estiramiento P-O, vibraciones de estiramiento simétricas y anti-simétricas en el grupo PO_2 , vibraciones de estiramiento simétricas y antisimétricas del grupo PO_3 y estiramiento anti-simétrico del puente P-O-P, respectivamente (Figura 2.24).

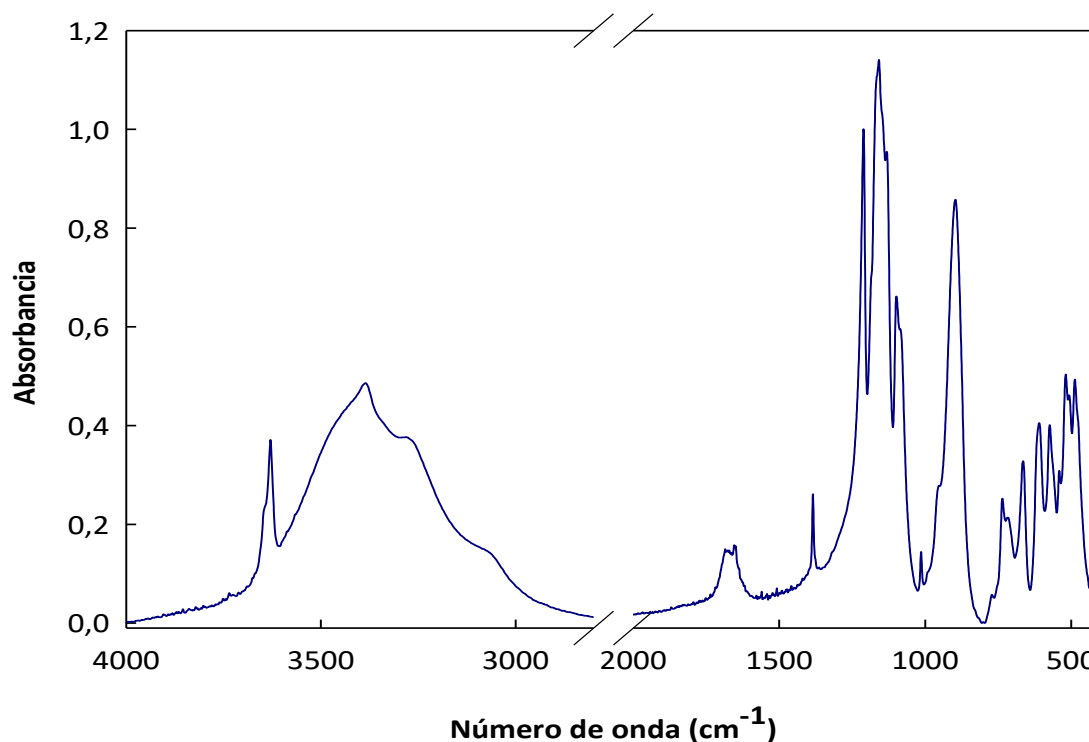


Figura 2.24 Espectro del tripolifosfato sódico obtenido mediante FTIR.

El espectro FTIR del quitosano entrecruzado mostró que la banda a 1562 cm^{-1} experimentó una reducción de la absorbancia y un desplazamiento a 1536 cm^{-1} luego de la reacción de conjugación con el TPP estableciendo enlaces iónicos. Este hecho podría

atribuirse a la unión entre los iones fosfato y los grupos amino del quitosano. Estas interacciones disminuyeron la solubilidad del quitosano y fueron las responsables de su separación de la solución bajo la forma de nanopartículas. El quitosano entrecruzado también mostró un pico característico del P=O a 1156 cm^{-1} (Bhumkar y col., 2006).

De acuerdo con Gierszewska-Drużyńska y Ostrowska-Czubenko (2011) la banda a 1210 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento P=O, confirmó la interacción entre los grupos -NH_3^+ del quitosano y los iones del TPP como se observó en los espectros de las suspensiones N₁₂ y N₁₅ (Figura 2.23 a).

Como puede observarse en la Figura 2.23 a y b, las diferencias entre los espectros de N₁₂ y N₁₅ fueron debidas principalmente a la intensidad de las bandas características del TPP, dado que las dos formulaciones sólo difirieron en la relación Q:TPP (3 y 5, respectivamente). En todos los espectros, se observaron las vibraciones características de los grupos hidroxilo y amino libres, localizados en la región entre $3450\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ (Figura 2.23 b). Esta región experimentó modificaciones probablemente asociados al entrecruzamiento iónico de TPP que produjo cambios en el modo de vibración del grupo -OH e indicó una vibración específica del grupo -NH (Lima y col., 2014). (Figura 2.23 b).

En el mismo sentido, bandas características del TPP pudieron ser observadas en los espectros de N₁₂ y N₁₅ tales como el pico ubicado a 1096 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento simétrico y antisimétrico en el grupo PO_3) y a 902 cm^{-1} (estiramiento antisimétrico del puente P-O-P) (Gierszewska-Drużyńska y Ostrowska-Czubenko, 2011). A partir de los espectros se vislumbra que en presencia de mayores concentraciones de TPP, las diferencias observadas entre las suspensiones de nanopartículas N₁₂ y N₁₅, o N₁₂ vacía y N₁₅ vacía resultaron más marcadas. La región espectral $2800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ también mostró diferencias entre las partículas cargadas con compuesto activo y las nanoestructuras vacías (espectros insertos en la Figura 2.25). Esta región se atenuó en ausencia de AG respecto a su correspondiente región espectral con ácido gálico. Estos cambios podrían estar relacionados con las interacciones puente de hidrógeno las cuales se intensificaron en presencia de AG.

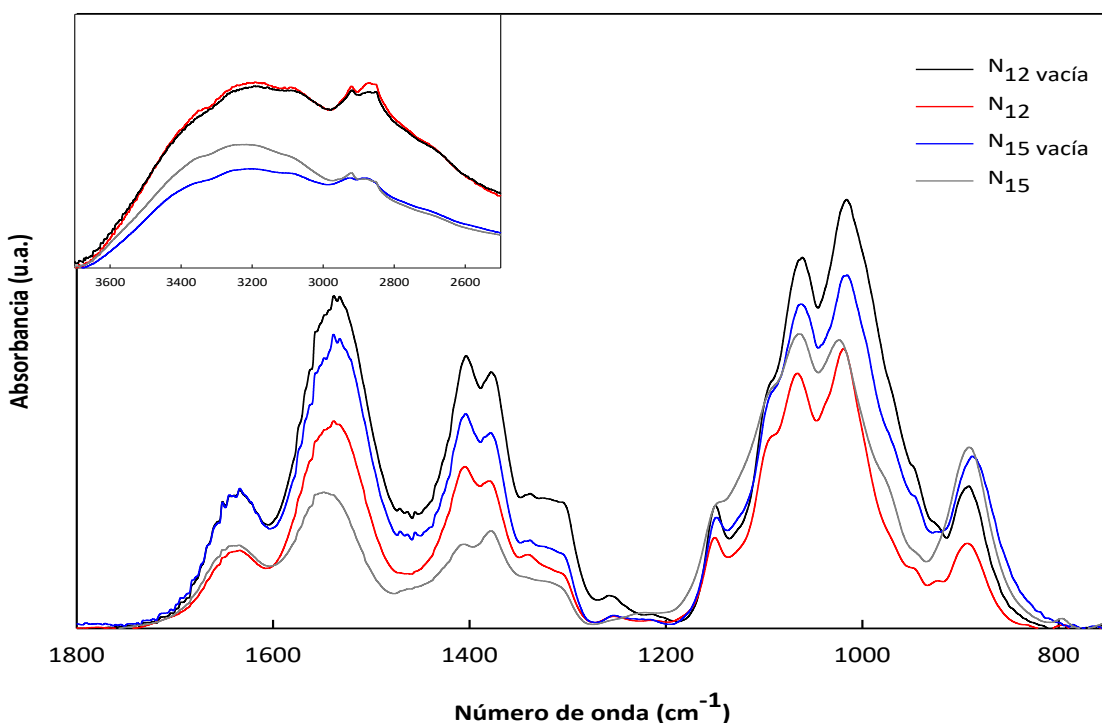


Figura 2.25. Espectros FTIR de suspensiones de nanopartículas funcionalizadas con AG y vacías (N_{12} , N_{15} y N_{12} o N_{15} vacías) en la región de longitud de onda comprendida entre 1800-800 cm^{-1} . La Figura inserta muestra la región espectral 3600-2600 cm^{-1} .

De acuerdo con lo informado por Wu y col. (2005), el entrecruzamiento generó un ensanchamiento de pico en esta región, indicando un aumento en el número de enlaces puente de hidrógeno

2.3.7 Actividad antioxidante del ácido gálico

En el ensayo del DPPH se observó la decoloración del reactivo con el aumento de la concentración de AG en las soluciones ensayadas. Esta decoloración, está asociada con un

mayor porcentaje de inhibición, en otras palabras, se relaciona con la capacidad de donación de hidrogeno del compuesto activo.

Tal como se muestra en la Figura 2.26, a partir de la regresión lineal se pudo estimar la concentración de AG capaz de secuestrar radicales DPPH. La actividad antioxidante expresada como concentración inhibidora media (IC_{50}) resultó ser de $0,022 \text{ mg ml}^{-1}$ tal como se indicó en la Figura 2.26.

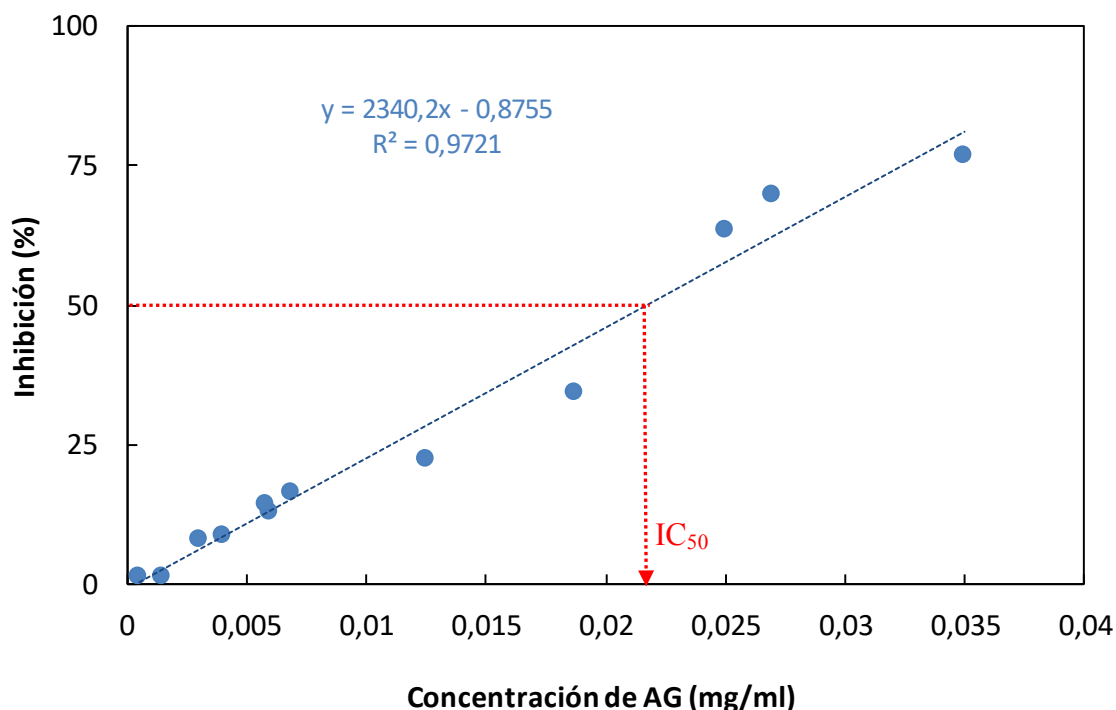


Figura 2.26. Determinación gráfica de la concentración de ácido gálico necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial del DPPH (IC_{50}).

En este punto conviene detenerse para remarcar que las suspensiones de nanopartículas seleccionadas para su ensamblado en una matriz soporte de quitosano (N_{12} y N_{15}), se formularon con una concentración de compuesto activo de $50 \text{ mg}_{AG}/\text{g}_Q$. Teniendo en cuenta que la concentración de la solución de Q fue del 0,75% p/v, la cantidad de AG incorporada fue de 35,5 mg cada 100 ml de solución de Q. Asimismo, considerando la eficiencia de

encapsulación de estas nanopartículas, la cual se encuentra alrededor del 80-85% la concentración de AG libre o encapsulada resultó significativamente superior al IC₅₀.

2.4 Conclusiones

Las nanopartículas a base de quitosano cargadas con ácido gálico fueron satisfactoriamente sintetizadas mediante la técnica de gelificación ionotrópica con TPP.

Los estudios realizados por TEM revelaron que las nanopartículas presentaron una estructura esférica discreta. Los espectros de FTIR mostraron la existencia de enlaces del tipo puente de hidrógeno y de interacciones iónicas establecidas entre el Q y el TPP lo cual permitió confirmar la encapsulación y la mejora de la estabilidad del compuesto activo.

La metodología del diseño experimental estadístico puso de manifiesto la factibilidad del procedimiento de optimización en el desarrollo de nanopartículas con AG encapsulado. Los parámetros de diseño de las nanopartículas de Q funcionalizadas se optimizaron a través del uso de una superficie de respuesta. Las respuestas analizadas, como el potencial zeta y el porcentaje de eficiencia de encapsulación que permitieron optimizar el sistema, fueron dependientes de los parámetros de diseño, concentración de Q, relación Q:TPP y concentración de AG. La metodología de deseabilidad global utilizada encontró como formulación óptima 0,76% de Q, relación Q:TPP de 5 y 37 mg AG/g Q que dió como resultado valores de +50 mV para PZ y 82% para PEE.

Otros análisis complementario a la optimización demostraron que las suspensiones más estables fueron obtenidas combinando concentraciones de quitosano en el rango entre 0,5 y 0,75% p/v con relaciones de Q:TPP mayores que 3. Estas suspensiones fueron caracterizadas por su alta estabilidad confirmada por los valores de PZ y de transmitancia los que fueron más altos que +25 mV y 0,21 en promedio, respectivamente, así como por su diámetro de nanopartículas el cual fue de aproximadamente 140 nm.

Considerando los resultados obtenidos a partir del proceso de optimización y los estudios de estabilidad de las suspensiones se seleccionaron las formulaciones N₁₂ y N₁₅ para su inclusión en una matriz de quitosano.

Basado en estos resultados, se puede concluir que las formulaciones de nanopartículas propuestas podrían ser potenciales candidatas para la encapsulación y la liberación controlada de compuestos activos con capacidad antioxidante a fin de ser utilizadas en la preservación de alimentos.

Referencias

Akakuru, I.B., y Isiuku, B.O. (2017). Chitosan hydrogels and their glutaraldehyde-crosslinked counterparts as potential drug release and tissue engineering systems-synthesis, Characterization, swelling kinetics and mechanism. *Journal of Physical Chemistry y Biophysics*, 7(3). DOI: 10.4172/2161-0398.1000256

Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., y Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Shojaosadati, S. A., Dorkoosh, F. A., y Elsabee, M. Z. (2011). Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, 126(3), 935-940.

Alonso, C., Lucas, R., Barba, C., Marti, M., Rubio, L., Comelles, F., Morales, L. Coderch, J. C., y Parra, J. L. (2015). Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(7), 900-908.

Amenaghawon, N. A., Ogbeide, S. E., y Okieimen, C. O. (2014). Application of statistical experimental design for the optimisation of dilute sulphuric acid hydrolysis of cassava bagasse. *Acta Polytechnica Hungarica*, 11(9), 239-250.

Amini, M., Younesi, H., Bahramifar, N., Lorestani, A. A. Z., Ghorbani, F., Daneshi, A., y Sharifzadeh, M. (2008). Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 694-702.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., y Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.

Bhumkar, D.R., y Pokharkar, V.B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 7(2), E138-E143.

Bitaraf, M. S., Khodaiyan, F., Mohammadifar, M. A., y Mousavi, S. M. (2012). Application of response surface methodology to improve fermentation time and rheological properties of probiotic yogurt containing *Lactobacillus reuteri*. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1394-1401.

Box, G. E., Hunter, J. S., y Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery* (Vol. 2). New York: Wiley-Interscience.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bugnicourt, L., Alcouffe, P., y Ladavière, C. (2014). Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloiddally stable objects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 476-486.

Caddeo, C., Díez-Sales, O., Pons, R., Carbone, C., Ennas, G., Puglisi, G., Fada, A.M., y Manconi, M. (2016). Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 461, 69-78.

Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., y Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.

Camino, N.A., y Pilosof, A.M. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062.

Carbone, C., Campisi, A., Manno, D., Serra, A., Spatuzza, M., Musumeci, T., Bonfanti, R., y Puglisi, G. (2014). The critical role of didodecyldimethylammonium bromide on physico-chemical, technological and biological properties of NLC. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 1-10.

Cerimedo, M. S. Á., Iriart, C. H., Candal, R. J., y Herrera, M. L. (2010). Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose. *Food Research International*, 43(5), 1482-1493.

Christoforidis, J. B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., y Cebulla, C. M. (2012). Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators of Inflammation*.

de Pinho Neves, A. L., Milioli, C. C., Müller, L., Riella, H. G., Kuhnen, N. C., y Stulzer, H. K. (2014). Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 34-39.

Derringer, G., y Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219.

Deng, Q. Y., Zhou, C. R., y Luo, B. H. (2006). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology*, 44(5), 336-342.

Elsayed, M. M., y Cevc, G. (2011). Turbidity spectroscopy for characterization of submicroscopic drug carriers, such as nanoparticles and lipid vesicles: size determination. *Pharmaceutical Research*, 28(9), 2204-2222.

Fiorda, F. A., Soares Jr, M. S., da Silva, F. A., de Moura, C. M. A., y Grossmann, M. V. E. (2015). Physical quality of snacks and technological properties of pre-gelatinized flours formulated with cassava starch and dehydrated cassava bagasse as a function of extrusion variables. *LWT-Food Science and Technology*, 62(2), 1112-1119.

Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., y McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2-3), 65-73.

Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., y Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.

Ghoreishi, S. M., Behpour, M., y Khoobi, A. (2012). Central composite rotatable design in the development of a new method for optimization, voltammetric determination and electrochemical behavior of betaxolol in the presence of acetaminophen based on a gold nanoparticle modified electrode. *Analytical Methods*, 4(8), 2475-2485.

Gierszewska-Drużyńska, M., y Ostrowska-Czubenko, J. (2011). Influence of crosslinking process conditions on molecular and supermolecular structure of chitosan hydrogel membrane. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. Polish Chitin Society, Łódź, 15, 22.

Goycoolea Valencia, F. M., Remuñán López, C., y Alonso M. J. (2009) Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: (Vila Jato, J.L. ed.) *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pag. 103-113.

Kim, H. S., Park, W. I., Kang, M., y Jin, H. J. (2008). Multiple light scattering measurement and stability analysis of aqueous carbon nanotube dispersions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(5-6), 1209-1212.

Hassanovic, A., Zehl, M., Reznicek, G., y Valenta, C. (2009). Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(12), 1609-1616.

Lima, H.A., Lia, F.M.V., y Ramdayal, S. (2014). Preparation and characterization of chitosan-insulin-tripolyphosphate membrane for controlled drug release: effect of cross linking agent. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 5(04), 211-217.

Honary, S., y Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265-273.

Hunter, R. J. (2013). *Zeta potential in colloid science: principles and applications* (Vol. 2). Academic Press.

Janardhanan, S. K., Ramasamy, I., y Nair, B. U. (2008). Synthesis of iron oxide nanoparticles using chitosan and starch templates. *Transition Metal Chemistry*, 33(1), 127-131.

Jawahar, N., y Meyyanathan, S. N. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 1(4), 217.

Jonassen, H., Kjøniksen, A.L., y Hiorth, M. (2012). Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 13(11), 3747-3756.

Jonassen, H., Kjøniksen, A.L., y Hiorth, M. (2012). Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, 290(10), 919-929.

Katas, H., Raja, M.A.G., y Lam, K.L. (2013). Development of chitosan nanoparticles as a stable drug delivery system for protein/siRNA. *International Journal of Biomaterials*, 2013. DOI: 10.1155/2013/146320

Konecsni, K., Low, N. H., y Nickerson, M. T. (2012). Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food Chemistry*, 134(4), 1775-1779.

Lee, K. M., y Hamid, S. B. A. (2015). Simple response surface methodology: investigation on advance photocatalytic oxidation of 4-chlorophenoxyacetic acid using UV-active ZnO photocatalyst. *Materials*, 8(1), 339-354.

Lorenzo, G., Zaritzky, N., y Califano, A. (2015). Mechanical and optical characterization of gelled matrices during storage. *Carbohydrate Polymers*, 117, 825-835.

Lou, H., Hu, Y., Zhang, L., Sun, P., y Lu, H. (2012). Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values. *LWT-Food Science and Technology*, 47(1), 19-24.

Luo, Y., Zhang, B., Cheng, W. H., y Wang, Q. (2010). Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 942-951.

Nagpal, K., Singh, S. K., y Mishra, D. N. (2012). Nanoparticle mediated brain targeted delivery of gallic acid: in vivo behavioral and biochemical studies for improved antioxidant and antidepressant-like activity. *Drug Delivery*, 19(8), 378-391.

Mantilla, C., Pedraza, J., y Laverde, D. (2008). Application of zeta potential studies in the development of an alternative process for the flotation of feldspar minerals. *DYNA*, 75(154), 65-71.

Melik, D.H., y Fogler, H.S. (1983). Turbidimetric determination of particle size distributions of colloidal systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 92(1), 161-179.

Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., y Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), 111-123.

Mishra, P.R., Al Shaal, L., Müller, R.H., y Keck, C.M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1-2), 182-189.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., y Anderson-Cook, C. M. (2016.) *Response Surface Methodology in Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, third ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Papadimitriou, S. A., Achilias, D. S., y Bikiaris, D. N. (2012). Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly (glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 430(1-2), 318-327.

Papadimitriou, S., Bikiaris, D., Avgoustakis, K., Karavas, y E., Georgarakis, M. (2008). Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate Polymers*, 73, 44–54.

Pasanphan, W., y Chirachanchai, S. (2008). Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 169-177.

Patel, A., Hu, Y., Tiwari, J. K., y Velikov, K. P. (2010). Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles. *Soft Matter*, 6(24), 6192-6199.

Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., Maricato, É., Nunes, C., Coimbra, M. A., y Vicente, A. A. (2015). Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 115, 1-9.

Ramadan, E., Borg, T., Abdelghani, G. M., y Saleh, N. M. (2016). Transdermal microneedle-mediated delivery of polymeric lamivudine-loaded nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 5(1), 1.

Rao, P. J., y Geckelera, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887–913.

Rivero, S., García, M.A., y Pinotti, A. (2010). Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films, *Carbohydrate Polymers*, 82, 270–276.

Rodríguez, P. M. (2005). Efecto de los polifenoles del vino en la protección frente al estrés oxidativo. In *Viticultura y enología en la DO Ribera del Duero: Ponencias del IV Curso de verano Viticultura y Enología en la DO Ribera del Duero, 2004*] (pp. 97-104). Consejo Regulador de la Denominación de Origen Ribera del Duero.

Salazar, C.M.J. (2013). Estudio de liberación controlada de antocianinas a partir de películas de quitosano despolimerizado y reticulado con tripolifosfato de sodio. Tesis de grado.

Schreiber, S. B., Bozell, J. J., Hayes, D. G., y Zivanovic, S. (2013). Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 207-214.

Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Parize, A. L., Silva, M. A. S., y Laranjeira, M. C. M. (2009). Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 387-392.

Tang, D. W., Yu, S. H., Ho, Y. C., Huang, B. Q., Tsai, G. J., Hsieh, H. Y., Sung, H.W., y Mi, F. L. (2013). Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and an edible polypeptide. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 33-41.

Teng, Z., Luo, Y., y Wang, Q. (2013). Carboxymethyl chitosan–soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*, 141(1), 524-532.

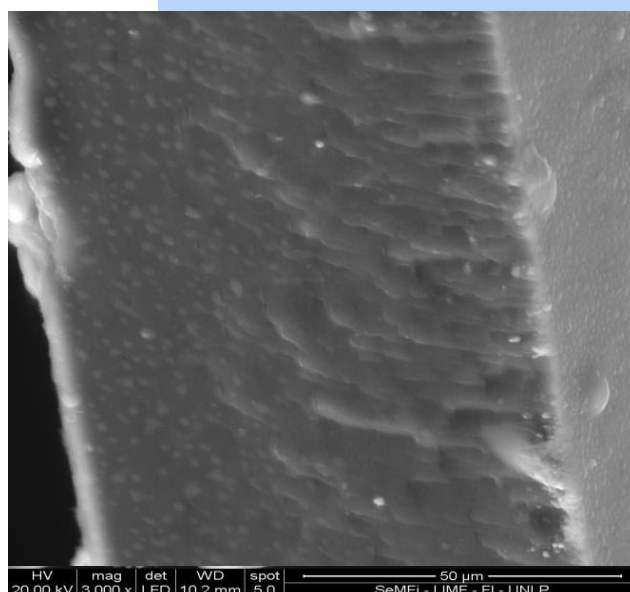
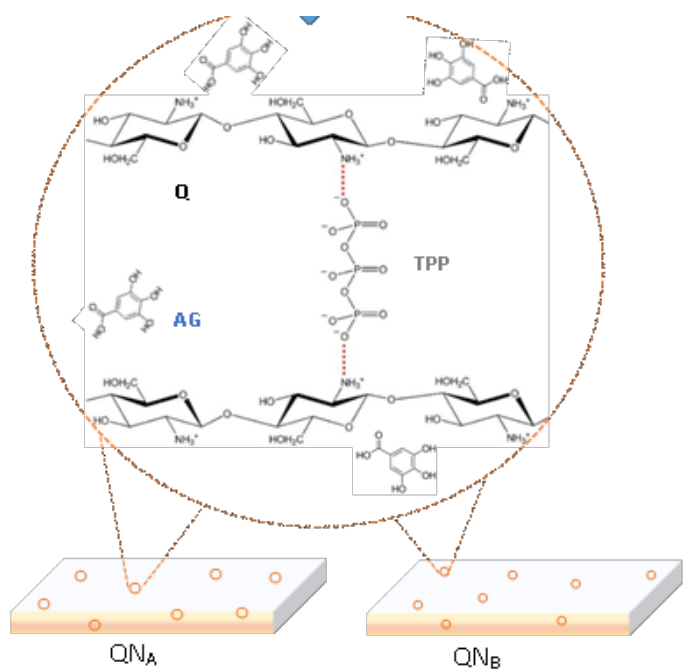
Xie, M., Hu, B., Wang, Y., y Zeng, X. (2014). Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(37), 9128-9136.

Verma, S., Singh, A., y Mishra, A. (2013). Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 473-485.

Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., y Fu, S. (2005). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 295(1-2), 235-245.

Zhang, J., Fan, Y., y Smith, E. (2009). Experimental design for the optimization of lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(5), 1813-1819.

Capítulo 3



Parte I

3.1.1 Introducción

El desarrollo de diferentes alternativas para garantizar la preservación de compuestos activos en el producto final es actualmente uno de los focos de atención de las industrias farmacéuticas y alimenticias (Pisoschi y col., 2018). La nanoencapsulación proporciona protección a los compuestos bioactivos (vitaminas, antioxidantes, proteínas, nutraceuticos, micronutrientes) en estructuras a nivel nanoescala (Ezhilarasi y col., 2013; Yousuf y col., 2016). Esta estrategia de preservación de los compuestos activos, facilita su manejo, mejora su estabilidad (Weiss y col., 2006) y permite la liberación controlada del núcleo mejorando la funcionalidad y la seguridad de los alimentos, el valor nutricional y los atributos sensoriales.

En esta dirección, Othman y col. (2018) desarrollaron nanopartículas de quitosano funcionalizadas con agentes antioxidantes de carácter hidrofílico e hidrofóbico, L-ácido ascórbico y timoquinona, respectivamente. Liu y Ho (2017) encapsularon scutellarin, flavona proveniente de *Erigeron breviscapus* (Vant.), usando quitosano y ciclodextrina entrecruzados con tripolifosfato sódico.

En línea con este desarrollo, la dispersión homogénea de partículas de dimensiones nanométricas en el interior de una matriz polimérica conforma un material denominado nanocompuesto. Estos materiales de naturaleza híbrida que resultan del ensamblaje de dos fases con distintas características permiten el diseño de materiales con propiedades ajustadas. Dependiendo de las propiedades aportadas por la matriz polimérica o por el relleno, estos materiales híbridos nanoestructurados pueden presentar propiedades funcionales adecuadas para aplicaciones en diferentes áreas. De acuerdo a Gorrasi y col. (2008) y Peponi y col. (2009) los nanocompuestos resultan de la combinación de una matriz polimérica y una fase dispersa que actúa como relleno el cual puede ser de naturaleza inorgánica/orgánica con al menos una dimensión en el escala nanométrica. La interacción entre las nanoestructuras y la matriz polimérica es la base para obtener mejores propiedades mecánicas y funcionales de los nanocompuestos en relación a los materiales compuestos

convencionales (Hosseini y col., 2015). En las décadas pasadas se ha producido un aumento sostenido de investigaciones destinadas a mejorar las propiedades de materiales empleando nanoestructuras aprovechando la alta relación área superficial a volumen (Qiao y Brinson, 2009). Los nanocompuestos a menudo muestran un excelente balance entre fuerza y dureza y exhiben mejores propiedades comparadas con sus componentes individuales (Armentano y col., 2010; Tjong, 2006).

Si bien la inclusión de nanopartículas permite mejorar el comportamiento de los materiales, es necesario un control adecuado de su estructura, morfología y tamaño, ya que estos parámetros influyen de forma directa sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales nanocompuestos obtenidos. Asimismo, el nivel de dispersión del relleno en la matriz polimérica y la adherencia existente en la interfase matriz-relleno afectan las propiedades mecánicas, la compatibilidad y el desempeño de los mismos. Por lo tanto, las características de los nanomateriales y el método de obtención de las partículas determinan las propiedades y potenciales aplicaciones del nanocompuesto sintetizado.

Los polímeros constituyen el material base para la fabricación de nanocompuestos y en esta línea muchos materiales poliméricos biodegradables han sido usados en este campo. Ellos pueden ser clasificado como: (1) polímeros naturales, incluyendo polisacáridos (celulosa, pectina, almidón, alginato, quitina/quitosano, ácido hialurónico, kefirán) o proteínas (soja, gelatina, colágeno, geles, seda) y polímeros sintéticos, como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), (PCL), polihidroxibutirato (PHB) (Koegler y Griffith, 2004; Shin y col., 2003; Wen y Tresco, 2006).

La aplicación de nanocompuestos promete ampliar la aplicación de películas comestibles y biodegradables en usos específicos (Lagaron y col., 2005; Ray y Bousmina, 2005). Adicionalmente, partículas inorgánicas pueden ser utilizadas para introducir múltiples funcionalidades como color y aroma, pero también actuar como vehículos para la liberación controlada de compuestos activos o fungicidas (Lee y col., 2003).

Si bien el desarrollo de materiales nanocompuestos a base de una matriz polimérica y una fase de relleno de naturaleza inorgánica ha sido vastamente analizado, son pocos los estudios que exploren la inclusión de nanopartículas poliméricas sólidas preparadas a partir de polímeros naturales. En este sentido, Hosseini y col. (2015) desarrollaron nanocompuestos a base de gelatina de pescado usando nanopartículas de quitosano como refuerzo. Películas de quitosano reforzadas con nanocristales de celulosa (Corsello y col., 2017) exhibieron mejoras en las propiedades mecánicas conservando su capacidad antimicrobiana. La inclusión de nanopartículas de quitosano es una estrategia que ha sido utilizada en matrices de hidroxipropilcelulosa (de Moura y col., 2009); asimismo se han incorporado partículas de Q a matrices de ácido poliláctico (PLA) para mejorar sus propiedades mecánicas y antimicrobianas (Bonilla y col., 2013).

Otro concepto a tener en cuenta es el de envase activo, definido como un tipo de envase en el que la película, el producto y el medio o entorno interactúan para prolongar la vida útil proporcionando una protección activa (Biji y col., 2015) (Figura 3.I.1).

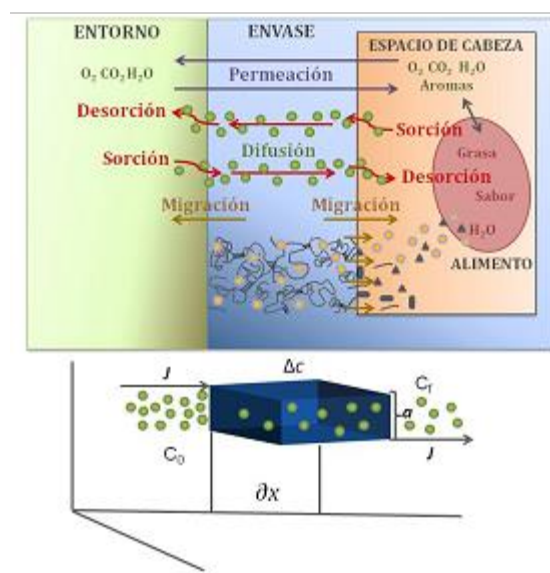


Figura 3.I.1. Esquema representativo de envase activo mostrando distintas interacciones con el entorno y con la matriz alimenticia (Arrieta, 2014).

Para desarrollar materiales biodegradables activos con actividad antioxidante destinados al envasado de alimentos, se han formulado películas con la inclusión directa de compuestos fenólicos, vitaminas, carotenoides (Brum y col., 2017; López-Rubio y Lagaron, 2011; Noronha y col., 2014; Santana y col., 2013). La incorporación de estos compuestos puede proporcionar mayor barrera a la luz visible y UV, menor permeabilidad al vapor de agua debido al carácter hidrofóbico de los compuestos activos, mejorando la estabilidad oxidativa de alimentos con un alto contenido de lípidos. (Assis y col., 2017; Martins y col., 2012; Noronha y col., 2014; Pagno y col., 2016; Reis y col., 2015; Souza y col., 2011) Este punto es importante considerando a la oxidación como una de las mayores causas de deterioro en alimentos.

En esta línea, el quitosano ha sido utilizado en el diseño de películas activas con diversas funcionalidades tales como antioxidantes (Zhang y col., 2019; Hu y col., 2015), antimicrobianas para la conservación de alimentos (van den Broek y col., 2015; Latou y col., 2014) o para usos biomédicos (Shariatnia y Fazli 2015) entre otras aplicaciones.

El ensamblado de estos conceptos de vanguardia (nanopartículas, nanocompuestos y envases activos), conducen al desarrollo de matrices nanocompuestas funcionalizadas con compuestos activos. Por lo tanto, la combinación de materiales activos con compuestos reforzados con nanopartículas ha permitido formular nanocompuestos con propiedades diferenciales. Por un lado son capaces de mejorar el material desde el punto de vista mecánico y de barrera, y también cumplen un rol desde la perspectiva de la protección y vehiculización del compuesto activo.

Liu y col. (2015) prepararon nanocompuestos activos formulados con gelatina funcionalizada con nanopartículas de quitosano cargadas con polifenoles para investigar la influencia de diferentes proporciones en las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de las películas. De igual forma, Assis y col. (2017) trabajaron sobre películas activas de almidón de maíz cargadas con nanocápsulas de licopeno.

Siró y col. (2006) incorporaron un complejo de encapsulación de tocoferol/ β -ciclodextrina en película de LDPE y demostraron que el complejo ralentizó la liberación de tocoferol

debido a la baja solubilidad de la β -ciclodextrina en el simulante alimenticio graso. Otros ejemplos de compuestos activos encapsulados en el envase incluyen películas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) con inclusión de nanoencápsulas de lecitina cargadas con nisina (Imran y col., 2012), películas de HPMC con extracto de té verde en nanopartículas de PLA (Wrona y col., 2017a) y películas de polietileno (PE) cargadas con cápsulas de extracto de té verde (Wrona y col., 2017b).

En este marco, los objetivos planteados para este Capítulo fueron:

- Obtener películas activas por inclusión directa de ácido gálico en la matriz de quitosano
- Incorporar suspensiones de nanopartículas (N) funcionalizadas con ácido gálico como estrategia para obtener películas nanocompuestas activas con diferentes relaciones Q:TPP y Q:N
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera de los nanocompuestos desarrollados

3.1.2 Materiales y métodos

3.1.2.1 Obtención de películas nanocompuestas

La metodología para la obtención de las nanopartículas se describió previamente en la *Sección 2.2 del Capítulo 2*.

Las formulaciones seleccionadas para su inclusión en la matriz de quitosano se corresponden con las suspensiones denominadas N_{12} y N_{15} del *Capítulo 2*. Como ya se describió fueron preparadas con 0,75% p/v de Q, relaciones Q:TPP 5 y 3, respectivamente y 50 mg de AG/g de Q. La nomenclatura utilizada para estas muestras será N_A y N_B , respectivamente.

Diferentes proporciones de las suspensiones de nanopartículas N_A y N_B (50, 100 y 200 ml) se dispersaron en una solución filmogénica de quitosano (100 ml), preparada al 1,5% p/v por solubilización en ácido acético al 1,5% v/v, para obtener relaciones Q: $N_{A,B}$ 1:0,5, 1:1 y 1:2 v/v obteniendo con concentraciones finales de quitosano de 0,0125, 0,0112 y 0,0100 g/ml. Los

nanocompuestos se obtuvieron por el método de moldeo y posterior secado a 37°C durante 16 h en estufa de convección forzada. Asimismo, se prepararon películas de quitosano control por solubilización en ácido acético al 1,5% v/v. Asimismo, para evaluar la influencia de la inclusión directa del compuesto activo en la matriz de quitosano se formularon películas funcionalizadas con AG en la misma concentración que las suspensiones N_A o N_B (50 mg_{AG}/g_Q) como se muestra en la Figura 3.1.2.

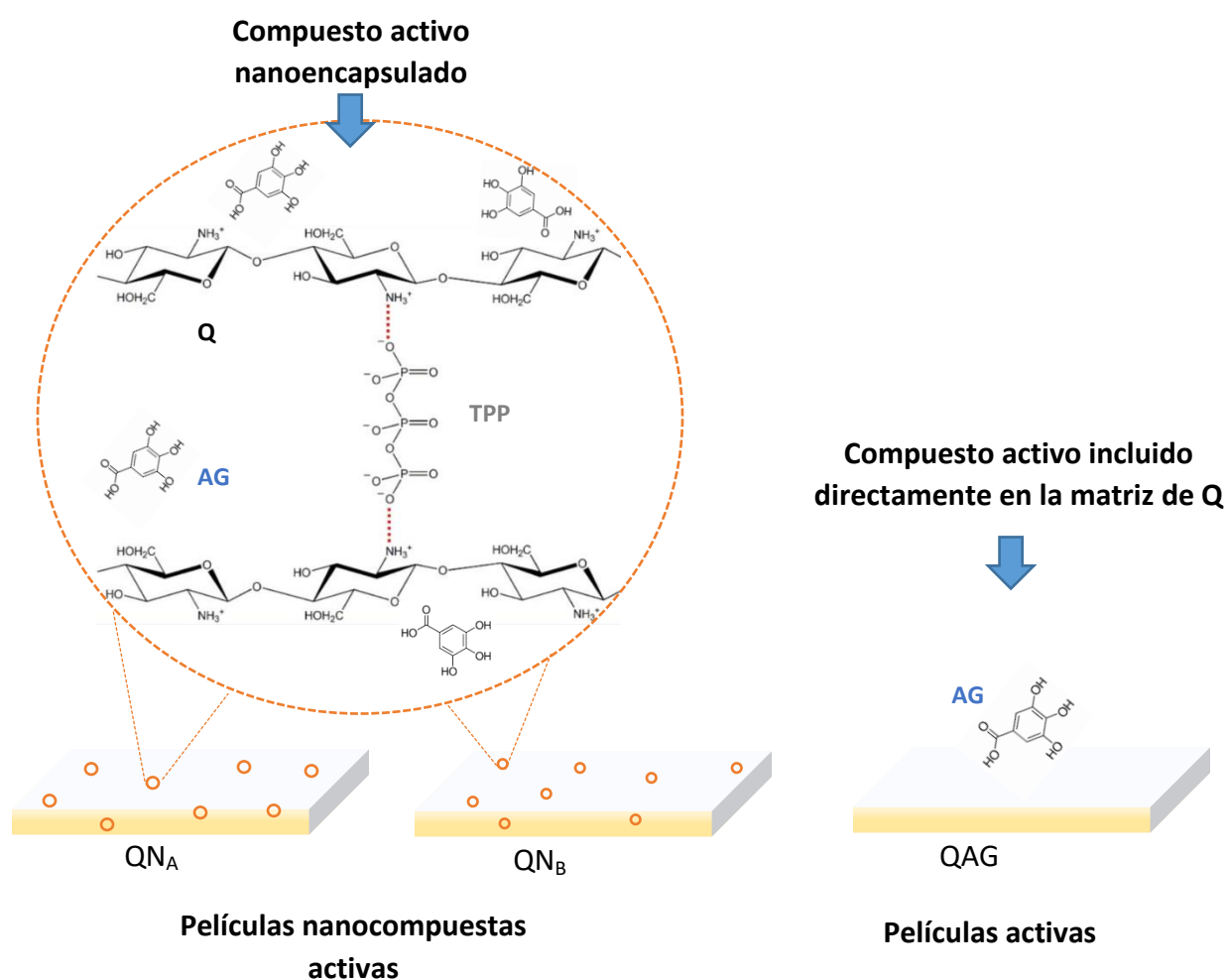


Figura 3.1.2. Esquema representativo de los sistemas obtenidos por moldeo.

La nomenclatura utilizada para los sistemas nanocompuestos formulados con suspensiones N_A y N_B será: QN_A y QN_B indicando en cada caso la relación entre el polímero y la suspensión de nanopartículas $Q:N_{A,B}$ 1:0,5, 1:1 y 1:2.

3.1.2.2 Propiedades físicoquímicas de las películas

El contenido de humedad de las películas se cuantificó midiendo la pérdida de peso mediante secado en estufa a 105°C hasta llegar a peso constante. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados fueron expresados en gramos de agua cada 100 g de muestra.

La solubilidad de las películas fue determinada de acuerdo al método descrito por Rivero y col. (2010). Muestras de 3x3 cm se pesaron y colocaron en vasos de precipitado conteniendo 100 ml de agua destilada bajo agitación constante durante 1 hora a 20°C. Las piezas remanentes se extrajeron del agua, se secaron en estufa a 105±1°C hasta alcanzar un peso constante. Los valores informados corresponden al promedio de tres ensayos.

La capacidad de hinchamiento de las películas fue medida por inmersión de piezas previamente pesadas en 100 ml de agua destilada durante 1 hora (Rivero y col., 2010). Transcurrido este tiempo, las muestras se extrajeron y se secaron superficialmente para remover el exceso de agua y se pesaron nuevamente. El hinchamiento se calculó como fue descrito por Rivero y col. (2010). Las muestras fueron analizadas al menos por triplicado.

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{(w_i - w_f)}{w_i} \times 100 \quad [3.1.1]$$

donde,

w_i es la masa inicial de los especímenes antes de estar en contacto con agua y w_f es la masa de las muestras después de 1 hora de contacto con agua.

3.1.2.3 Medida de ángulo de contacto

El ángulo de contacto se toma como parámetro indicativo de la humectabilidad o mojabilidad de la superficie de un material. La superficie de una gota depende de la acción de las fuerzas que intervienen en la línea de contacto sobre la superficie del sólido, en la que se encuentran tres fases sólido-líquido, líquido-gas y sólido-gas (Fernández Cañete y García Alonso, 2013). Las fuerzas que actúan en este punto son tensiones superficiales que se relacionan de acuerdo con la siguiente ecuación de Young (1805):

$$\gamma_{sg} - \gamma_{sl} = \gamma_{lg} \cos \theta \quad [3.1.2]$$

donde,

γ_{sg} , γ_{sl} y γ_{lg} son las tensiones superficiales entre las interfases sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas, respectivamente, y θ es el ángulo de contacto con la superficie. Esta ecuación indica cómo se extiende un líquido sobre una superficie y sólo es válida para superficies ideales (lisas, homogéneas, no porosas, rígidas y químicamente inertes). El ángulo de contacto sólo depende de las propiedades físico-químicas de las tres fases de contacto y no varía por acción de la gravedad (Fernández Cañete, 2013; Marmur, 2006; Ruiz-Cabello, 2009).

En la Figura 3.1.3 se resume lo descrito en la ecuación de Young.

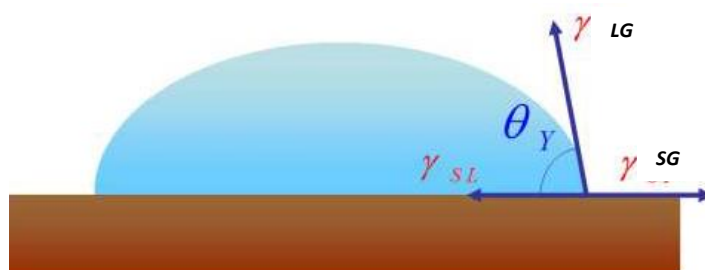


Figura 3.1.3. Esquema representativo del ángulo de contacto (θ) estático de una gota de agua sobre una superficie sólida plana, en contacto con una atmósfera gaseosa. Se indica el ángulo θ y las tensiones superficiales (γ) (Fernández Cañete, 2013).

El perfil que adopta la gota es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase (Figura 3.1.3). El ángulo de contacto (θ) está relacionado con las tres tensiones γ_{sg} , γ_{sl} , γ_{lg} . Si la suma de las tensiones de interfases sólido-líquido, líquido-gas es igual a la

suma de las tensiones de la interfase sólido-gas, el valor del ángulo θ es cero y el agua cubrirá la superficie. Por el contrario, si el valor de las tensiones de interfase sólido-gas es nulo $\theta=180^\circ$, la superficie permanece seca.

Para determinar la afinidad superficial de las películas con el agua (hidrofilicidad) se midió el ángulo de contacto de las distintas muestras utilizando un goniómetro Rame-Hart modelo 500 (Rame-Hart Instruments Co., USA). Se determinó el ángulo de contacto de cada gota a temperatura ambiente de 25°C . Las películas se montaron en láminas de vidrio $7,6\text{ cm} \times 2,5\text{ cm}$ sobre una cinta adhesiva bifaz. Para la determinación se colocó una gota de agua Mili-Q con una jeringa dispensadora sobre la superficie de la película. La morfología de la gota se registró con una cámara digital de alta definición. Se utilizó un software de análisis de imágenes (DROPimageAdvanced v2.2) para medir el ángulo de contacto. Se llevaron a cabo un mínimo de 8 medidas por película.

3.1.2.4. Propiedades de barrera

3.1.2.4.1. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La permeación de una sustancia a través de una matriz polimérica es conducida por un gradiente de concentraciones en la dirección de mayor a menor concentración. El mecanismo comprende tres pasos: adsorción del permeante sobre el lado de mayor concentración de la superficie de la película, difusión del permeante a través de la matriz y desorción desde el lado de menor concentración de la superficie de la película. Estos fenómenos de transferencia de materia permiten determinar la permeabilidad al vapor de agua, que se define como la capacidad de transporte de una sustancia permeante por unidad de tiempo, área y fuerza impulsora. Cuando la fuerza impulsora es una diferencia de concentraciones o presiones parciales, el transporte de masa se debe a la difusión. La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó de acuerdo una modificación de la norma ASTM E96 (Mali y col., 2002). El método permite cuantificar el flujo por unidad de área o la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR). Previo al ensayo, las muestras se almacenaron durante 48 horas a 65% de humedad relativa (HR). Para realizar las determinaciones, las películas se colocaron en celdas de acrílico (Figura 3.1.4), las que se

ubicaron en contenedores herméticos. El gradiente de 75% de HR a través de las películas se obtuvo poniendo sílica gel anhidra en el fondo de la celda (0% HR) y una solución saturada de NaCl en el contenedor (75% HR). La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona la fuerza impulsora para producir el flujo de vapor a través de la muestra. Este gradiente corresponde a 1753,55 Pa, expresado como presión parcial de vapor de agua a 20°C. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica con una precisión de 0,0001g. A intervalos de tiempo establecidos (Δt), se registró la variación de peso (Δp) de la celda, que es una medida de la cantidad de materia que fue transferida por unidad de área a través de la película. A partir de los ensayos se graficó la ganancia en peso de la celda en función del tiempo. Se realizó una regresión lineal de los datos obtenidos y se calculó la permeabilidad al vapor de agua ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) considerando el espesor de las películas y la diferencia de presión parcial de vapor de agua antes mencionada. Cada valor informado corresponde al promedio de al menos 4 determinaciones.



Figura 3.1.4. Celda de permeabilidad utilizada para evaluar las propiedades de barrera al vapor de agua.

3.1.2.4.2. Permeabilidad al oxígeno (PO_2)

Las determinaciones de las propiedades de barrera al oxígeno de las películas se llevaron a cabo usando un MOCON OX-TRAN Model 2/21 (Figura 3.1.5), (Mocon Inc., Minneapolis, EE.UU.) de acuerdo con la norma ASTM D3985-06 utilizando el método coulométrico.

La célula de ensayo se compone de dos cámaras separadas por la película. El nitrógeno que contiene 2% de hidrógeno se utilizó como gas portador o *carrier*. El oxígeno se transfiere a través de la película llegando al sensor coulométrico.

Previo al ensayo muestras con un área de 100 cm^2 se acondicionaron en una atmósfera de nitrógeno-hidrógeno ($\text{N}_2\text{-H}_2$) dentro de la unidad durante al menos 1-2 horas para eliminar las trazas de oxígeno atmosférico. Las medidas se realizaron a 760 mm Hg y 23°C con una HR del 65%. La permeabilidad al oxígeno se expresó como $\text{cm}^3\text{ m}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{ Pa}^{-1}$.

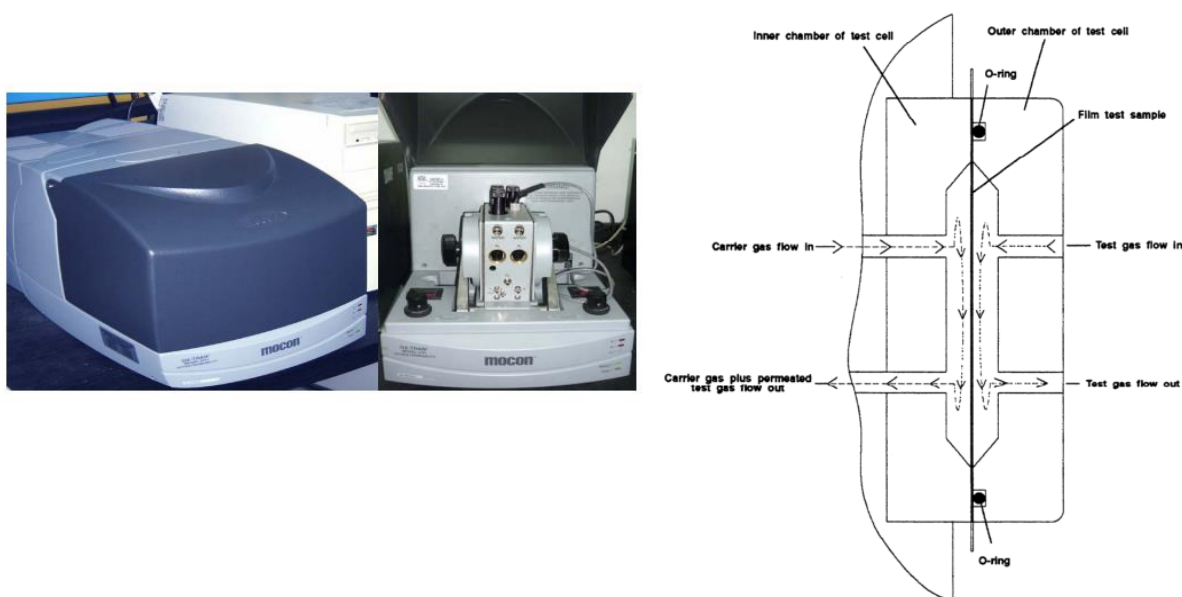


Figura 3.1.5. Equipo MOCON OX-TRAN utilizado para determinar las propiedades de barrera al oxígeno de las muestras.

3.1.3.5 Propiedades ópticas

Para evaluar las propiedades de barrera al UV, opacidad y transparencia, muestras de películas rectangulares ($1\times 4\text{ cm}$) fueron introducidas en celdas de cuarzo. Se utilizó un espectrofotómetro DU 650 (Beckman, USA) en el modo absorbancia. Los valores informados fueron la media aritmética de tres determinaciones.

El área bajo de la curva registrada, definida como la opacidad de la película, fue determinada por integración entre 400 y 700 nm (Villaruel y col., 2015). La opacidad fue informada en unidades de absorbancia por nanómetro. Asimismo, la transparencia de las películas fue calculada por el método descrito por Zhang y Han (2006) usando la relación entre la absorbancia a 600 nm y el espesor de las películas. Los resultados informados se expresaron como $A_{600} \text{ mm}^{-1}$. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Por otra parte, el color de las películas se midió mediante un colorímetro Minolta CR 400 Series (Osaka, Japón) calibrado con un estándar ($Y=93,2$; $x=0,3133$; $y=0,3192$). Se utilizó la escala CIELab midiendo la luminosidad (L) y las coordenadas cromáticas a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul). Se calculó la diferencia de color (ΔE) a partir de la siguiente ecuación (Rivero y col., 2010):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} \quad [3.1.2]$$

donde,

los parámetros L^* , a^* y b^* corresponden a las coordenadas del blanco de calibración.

Asimismo, se calculó el índice de pardeamiento (IP) utilizando la ecuación 3.1.3 (Tavera-Quiroz y col., 2015):

$$PI = \frac{[100 \left(\frac{a+1,75L}{5,645L+a-8,012b} - 0,31 \right)]}{0,172} \quad [3.1.3]$$

Otro parámetro que se calculó es el índice de blancura (IB) a través del uso de la ecuación 3.1.4 (Zhang y col., 2019):

$$BI = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad [3.1.4]$$

3.1.2.6 Propiedades mecánicas

El porcentaje de elongación a la ruptura y el esfuerzo fueron determinados a través del uso de un texturómetro TA.XT2i—Stable Micro Systems (England) mediante ensayos de

tracción con un sistema de pinzas de tensión A/TG según la norma ASTM D638-01 (2001) sobre un mínimo de diez probetas para cada formulación. Para los ensayos se utilizaron probetas de 60 mm de longitud y 70 mm de ancho obtenidas de las películas. La separación de las mordazas de tracción se fijó en 50 mm. La mordaza inferior permaneció fija mientras la otra se desplazó a una velocidad de 1 mm s^{-1} hasta la ruptura de la probeta. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación a la ruptura (mm) se registraron mediante el software Texture Expert Exceed. A partir de estos parámetros se calculó la resistencia a la tracción o el esfuerzo (N m^{-2}) que es una medida de la capacidad del material de resistir el esfuerzo de estiramiento. Se determinó realizando el cociente entre la fuerza necesaria para provocar la ruptura de la probeta y el área de la sección transversal (espesor por ancho de la probeta).

También se analizó el porcentaje de elongación definido como la variación de la longitud de las probetas con respecto a la longitud inicial. Otro parámetro que se determinó fue la tenacidad del material calculada como el área bajo la curva registrada curva, expresada en J (Siracusa y col., 2012).

3.1.2.7 Capacidad antimicrobiana

Para determinar la capacidad antimicrobiana se seleccionaron microorganismos patógenos típicos de alimentos tanto Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), como Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* spp.) procedentes de la cátedra de microbiología (Universidad Nacional de La Plata). *Candida vinaria* provino de una colección de levaduras del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria Agroalimentaria (CIATI). El procedimiento de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. fue realizado acorde a AOAC 46-115 (AOAC, 1980). Las colonias positivas fueron confirmadas por el kit API 20E (Biomerieux, France).

Candida vinaria fue cultivada en un medio conteniendo extracto de malta (1% Biokar, Francia), extracto de levadura (2% Biokar, Francia) y glucosa (1% Merck, Alemania). Las

bacterias *S. aureus*, *E. coli*, y *Salmonella* spp. fueron cultivadas en un caldo Mueller-Hinton (Merck, Alemania).

Todos los microorganismos evaluados se incubaron a 37°C durante 12 horas hasta llegar a una concentración de 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹ determinado por la densidad óptica de la suspensión (DO). A partir de este inóculo se prepararon diluciones de 1:10 con agua de peptona al 0,1% (Oxoid) para obtener una concentración de microorganismos del orden de 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹.

La inoculación de los medios de cultivo se realizó por incorporación de 100 µl de inóculo sobre la superficie del medio, esparciendo cuidadosamente el líquido usando la técnica del plato extendido. La capacidad antimicrobiana de las películas fue evaluada mediante el método de difusión en agar.

Los inóculos anteriormente descriptos se ensayaron empleando discos de películas de 1,5 cm de diámetro, los cuales se colocaron presionándolos de forma que se asegurara el contacto con la superficie del agar mediante el uso de pinzas estériles. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las películas de Q, QAG y los nanocompuestos (QN_A y QN_B con distinta proporción de nanopartículas). Los discos se depositaron sobre cajas de Petri con PCA (Merck) para los ensayos con bacterias y con Agar Malta para hongos, previamente sembradas con el inóculo correspondiente. Todas las muestras se incubaron a 37°C. Los ensayos se efectuaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. En todos los casos se realizaron observaciones visuales, se tomaron fotografías y se midieron las zonas de inhibición de las películas a las 24 y 48 horas de incubación.

Para ello, las fotografías fueron procesadas con un software específico de análisis de imágenes (Image J, NIH, USA). A partir del análisis gráfico de las placas, se determinaron el diámetro total de inhibición (Dti), el área del halo de inhibición (Ahi), considerada como el área de inhibición adyacente a la película y el porcentaje de inhibición del patógeno determinado a partir del cociente entre la suma de áreas de inhibición total correspondiente a los 3 discos dispuestos sobre la placa de Petri y el área de crecimiento del patógeno sobre

la placa ($112,6 \pm 1,3 \text{ cm}^2$) (Padget y col., 1998). Para garantizar la reproducibilidad de los resultados el ensayo se realizó por triplicado

3.1.2.8 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se aplicó el programa SYSTAT (SYSTAT Inc., Evanston, IL, USA). El análisis de varianza fue llevado a cabo por medio de medidas del procedimiento ANOVA. El test de Fisher LSD.

3.1.3 Análisis y discusión de resultados

3.1.3.1 Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla 3.1.1 se resumen las propiedades relacionadas con afinidad de las películas por el agua.

Tabla 3.1.1. Propiedades de resistencia al agua de las distintas películas formuladas a base de quitosano

Películas	Humedad (%)	Hinchamiento (%)	Solubilidad (%)
Q	14,3(0,01) ^a	921 (39) ^f	57,1 (2,4) ^a
QAG	19,7 (0,2) ^b	717 (2) ^e	14,9 (1,3) ^b
QN_A 1:0,5	21,7 (1,7) ^b	418 (15) ^d	16,7 (0,02) ^b
QN_A 1:1	28,1 (0,4) ^c	294 (23) ^b	15,1 (0,4) ^b
QN_A 1:2	28,0 (1,0) ^c	380 (12) ^{c,d}	14,0 (2,0) ^b
QN_B 1:0,5	23,7 (3,5) ^{b,c}	348 (30) ^{b,c}	17,4 (0,3) ^b
QN_B 1:1	27,7 (2,3) ^c	312 (23) ^c	15,1 (1,1) ^b
QN_B 1:2	26,4 (0,8) ^c	153 (8) ^a	15,1 (1,1) ^b

*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Las películas Q, QAG, QN_A y QN_B con distintas proporciones de suspensiones de nanopartículas presentaron un aspecto uniforme con espesores entre 60 y 70 μm .

Como puede verse en la Tabla 3.I.1, el contenido de humedad de las películas Q exhibió el valor más bajo mientras las matrices QN_A y QN_B (con distintas proporciones) mostraron valores más altos con respecto al control. Esto puede deberse a la presencia de ácido gálico en las películas QAG o en los nanocompuestos, compuesto de naturaleza hidrofílica con grupos –OH disponibles para interactuar con las moléculas de agua.

Índice de hinchamiento se refiere a la capacidad de una película para contener el agua en su matriz está estrechamente relacionado con la presencia de grupo hidrofílicos en su estructura (grupos amino, hidroxilo y carboxilo), capaces de interactuar con el agua (Pacheco y col., 2019). El hinchamiento de la película Q fue de 921% y experimentó una reducción debido a la incorporación directa de AG, indicando que el entrecruzamiento entre el quitosano y el AG reduce el número de sitios disponibles para formar enlaces de hidrógeno con el agua (Souza y col., 2017). Otros autores también encontraron que la inclusión directa de compuestos activos como el ácido tánico y ferúlico inducen reacciones de entrecruzamiento, reduciendo la capacidad de hinchamiento y la solubilidad de la matriz (Cao y col., 2007; Rivero y col., 2010; Rivero y col., 2014; Rubentheren y col., 2015).

Este efecto también se observó en las matrices nanocompuestas, resultados resultado similares fueron informados por de Moura y col. (2008). Con la inclusión de nanopartículas, la capacidad de hinchamiento de las películas disminuyó debido a reacciones de entrecruzamiento y a las interacciones de las partículas ensambladas con la fase continua de quitosano. De acuerdo a Ou y col. (2005), las reacciones de reticulación o de entrecruzamiento de la matriz restringen el movimiento de las moléculas permitiendo la formación de una estructura más compacta resultando en menores valores de hinchamiento. Asimismo, Hari y col. (2018), trabajando con películas de gelatina y quitosano, encontraron que el índice de hinchamiento disminuyó cuando se incorporaron nanocristales de almidón cargados con β -caroteno, probablemente debido a la interacción compleja entre los átomos

de N proveniente de los grupos amino del quitosano y los nanocristales funcionalizados con β -caroteno mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Por otra parte, si bien las principales interacciones dentro de la red se produjeron entre las cargas negativas del agente entrecruzante (TPP) y las cargas positivas de los grupos amino provenientes del quitosano, la presencia simultánea de TPP y AG contribuyó al fortalecimiento de las interacciones. Por lo tanto, esta reducción en el hinchamiento podría deberse a la formación de una red interconectada entre el quitosano, el tripolifosfato y el AG que restringiría la penetración de agua. Estos resultados resultaron análogos a los encontrados por Parize y col. (2012).

Mi y col. (1999) encontraron que las cadenas entrecruzadas iónicamente de Q-TPP no se disocian a pH neutro y por lo tanto el hinchamiento de los nanocompuestos puede ser mayormente atribuido a la hidratación o ionización de los grupos $-NH_2$ y $-OH$ libres pero no a la escisión de las cadenas de Q-TPP entrecruzadas.

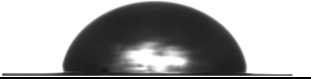







3.1.3.2 Ángulo de contacto

En la Tabla 3.1.2 se presentan las imágenes de las gotas de agua sobre el sustrato (película) y los valores de ángulo de contacto obtenidos para las muestras ensayadas.

El ángulo de contacto de la película control de quitosano fue similar al obtenido por Sivaselvi y Ghosh (2017) observándose una disminución en presencia de AG o de las nanopartículas funcionalizadas. Este resultado estuvo respaldado por el incremento en el contenido de humedad de las películas que mostró la misma tendencia. Nuevamente se pudo inferir que el AG al poseer más cantidad de sitios hidrofílicos tiene una mayor capacidad de interacción con el agua.

El valor del ángulo para las formulaciones QN_B con mayores proporciones de nanopartículas (1:1 y 1:2) no difirió del observado para la película QAG ($p > 0,05$), lo cual confirmó la suposición de la presencia de gálico libre en la superficie de la matriz.

Tabla 3.I.2. Ángulo de contacto de películas de quitosano y matrices funcionalizadas con AG formuladas por inclusión de nanopartículas (N_A o N_B) o incorporación directa del compuesto activo

Película	Angulo de contacto (°)	Imágen
Q	83,68 (4,44) ^d	
QAG	46,44 (4,17) ^a	
Q:N_A 1:0,5	75,02 (2,38) ^c	
Q:N_A 1:1	78,75 (2,16) ^{cd}	
Q:N_A 1:2	51,67 (4,69) ^b	
Q:N_B 1:0,5	56,69 (1,42) ^b	
Q:N_B 1:1	41,22 (3,28) ^a	
Q:N_B 1:2	41,61 (3,43) ^a	

*Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Estos resultados fueron análogos a los observados por Zhang y col. (2017) quienes trabajaron con matrices de poliamida modificadas con carboximetil quitosano funcionalizadas con nanopartículas de cobre. Sivaselvi y Ghosh (2017) también encontraron que el estrechamiento de quitosano con glutaraldehído y la inclusión de nanopartículas de hidroxiapatita con quitosano disminuyeron el ángulo de contacto, afirmando que estos resultados se pueden atribuir a la mayor disponibilidad de sitios hidrofílicos en la matriz.

Munshi y col. (2008) estudiaron la relación entre el tamaño de las nanopartículas y los ángulos obtenidos y obtuvieron una correlación positiva entre ambos parámetros. Estos autores señalaron que el ángulo de contacto y la energía libre superficial se encuentran relacionados de manera recíproca. En este sentido, la energía superficial puede ser una de las razones que explicaría la variación existente entre el ángulo de contacto y el tamaño de las nanopartículas ensambladas con la matriz de quitosano. Las nanopartículas de tamaño más pequeño (N_B) donde la relación de superficie a volumen fue mayor, la energía libre de superficie se incrementaría conduciendo a una disminución en el ángulo de contacto de la matriz. Un efecto opuesto se observó para las películas formuladas con partículas de mayor tamaño (QNA). Según Munshi y col. (2008) otros factores que inciden en los valores del ángulo son la rugosidad de la superficie, la distribución y la densidad de área de las nanopartículas en el sustrato lo que explicaría las diferencias encontradas entre los nanocompuestos.

3.1.3.3 Propiedades de barrera

La permeabilidad constituye una propiedad importante para estimar la vida útil de un producto o controlar la atmósfera con la que el alimento está en contacto y es un parámetro a tener en cuenta en la selección de un material de envase (Del Nobile, 2001).

Teniendo en cuenta la permeabilidad al vapor de agua, las películas de quitosano exhibieron un valor de $1,3 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, no presentando diferencias significativas con las matrices QAG y los nanocompuestos con menor proporción de nanopartículas ($p > 0,05$). Este hecho puede ser explicado en virtud de la concentración de AG en el sistema nanocompuesto en relación a la cantidad de suspensión de nanopartículas incorporadas. Por

otra parte, en las películas nanocompuestas QN_A y QN_B con mayor concentración de nanopartículas se observó una disminución significativa de la WVP ($p<0,05$) probablemente debido a un aumento de la tortuosidad de la matriz especialmente en el caso de las nanopartículas más pequeñas (Tabla 3.I.3). Como se ha mencionado en el *Capítulo 2* el radio hidrodinámico de las nanopartículas de la formulación N_B fue significativamente menor que el tamaño de N_A ($p<0,05$), lo que podría explicar la menor permeabilidad de estas formulaciones.

Resultados similares fueron encontrados por Hosseini y col. (2015) quienes trabajaron con matrices de gelatina de pescado modificadas con nanopartículas de quitosano. Los autores explicaron que este comportamiento se atribuye a una adecuada dispersión de las partículas dificultando así los fenómenos de transferencia de materia a través de la matriz. Este fenómeno también observado por Sanuja y col. (2015) quienes incorporaron nanopartículas de ZnO en matrices de quitosano, logrando una significativa disminución de la WVP al aumentar la concentración de nanopartículas en la matriz de biopolímero. Asimismo, estos autores detallaron que superando una determinada concentración se producía la aglomeración de las partículas con el consiguiente aumento de la permeabilidad.

En nuestro caso este efecto no fue observado, posiblemente como consecuencia de que la concentración de partículas no alcanzó esa masa crítica. No obstante, la incorporación de una concentración mayor de nanopartículas no fue posible debido al difícil manejo y rigidez alcanzada luego de la etapa de secado por las películas $QN_{A,B}$ 1:2 formuladas con mayores proporciones de partículas.

En lo que respecta a la permeabilidad al oxígeno, el quitosano presentó un valor de $6,4 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Este valor experimentó una reducción de aproximadamente el 50 % ($p<0,05$) con el agregado de AG; este resultado fue similar al observado por Sun y col. (2014). El agregado de la menor proporción de nanopartículas (1:0,5) generó un aumento en la permeabilidad al oxígeno con respecto al control. Sin embargo, mayores incrementos en el contenido de la suspensión revirtieron estos resultados y la PO_2 sufrió una reducción significativa ($p<0,05$). Estos resultados podrían relacionarse con la densidad de empaque obtenida en cada uno de los sistemas. Bajas proporciones de nanopartículas ($N_{A,B}$) inducen la

formación de una red con menor densidad facilitando flujo de materia, observándose un efecto contrapuesto para mayores proporciones de nanopartículas.

Comparando las formulaciones QN_B y QN_A, aquellas conteniendo nanopartículas de menor tamaño presentaron valores de PO₂ más bajos (p<0,05). Este resultado resultó similar al observado por de Moura y col. (2008).

Tabla 3.1.3. Propiedades de barrera de las distintas películas formuladas a base de quitosano

Películas	WVP ×10 ¹⁰	PO ₂ ×10 ¹⁵
	(g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	(cm ³ m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
Q	1,3 (0,1) ^c	6,4 (0,9) ^c
QAG	1,1 (0,1) ^c	3,1 (0,6) ^a
QN _A 1:0,5	1,3 (0,01) ^c	11,0 (0,5) ^d
QN _A 1:1	1,15 (0,2) ^c	8,0 (0,4) ^c
QN _A 1:2	0,8 (0,1) ^b	6,1 (0,3) ^{b,c}
QN _B 1:0,5	1,2 (0,1) ^c	16,1 (1,4) ^e
QN _B 1:1	0,84 (0,03) ^b	4,2 (0,1) ^{a,b}
QN _B 1:2	0,48 (0,09) ^a	7,0 (0,9) ^c

*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestras.

3.1.3.5 Propiedades ópticas

El estudio de la capacidad de absorción de radiación UV de las películas es relevante debido a que determina su posible aplicación para el envasado de alimentos (López y col., 2013).

Los espectros de absorción UV-visible de las películas de Q, QAG y nanocompuestas se muestran en la Figura 3.1.6 a y b. El pico de absorción del compuesto activo en solución se observó a 269 nm, ya sea incorporado en forma directa o encapsulado en la solución de Q

(suspensión de nanopartículas). Comparando los espectros de las suspensiones conteniendo nanopartículas, N_A y N_B , con tamaños de 458 y 140 nm respectivamente, se pudo observar que el tamaño tuvo una influencia significativa sobre el valor de la absorbancia ($p < 0,05$), que fue mayor con el aumento del diámetro de la partícula. Sin embargo, este efecto no se puso de manifiesto en suspensiones con mayor cantidad de nanopartículas, no existiendo diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$).

Por otra parte, todas las películas presentaron capacidad de barrera a la radiación UV observándose un pico característico en el rango 265-340 nm. Las películas de Q presentaron un pico apenas perceptible a 265 nm (Huang y col., 2014) mientras que en las matrices funcionalizadas con las nanopartículas el pico de absorbancia se fue incrementando significativamente ($p < 0,05$) con la concentración (Figura 3.1.6 a y b). A partir de los resultados obtenidos, puede inferirse que la presencia de AG aumentó la capacidad de barrera a la radiación de las películas a base de quitosano.

Como puede observarse en la Tabla 3.1.4 los valores de transparencia, opacidad y barrera al UV de las películas control Q fueron los más bajos. La transparencia y opacidad resultaron comparables a los informados por Rivero y col. (2009). El agregado de AG generó un aumento en los valores de todas las propiedades como puede verse en la Tabla 3.1.5. La Figura 3.1.6 mostró una mayor absorción en la región del visible con relación a la película Q. En general, la incorporación de nanopartículas en proporciones crecientes llevó a cambios significativos en todas las propiedades ópticas. Las formulaciones con mayor contenido de partículas aumentaron la barrera al UV. Los valores de transparencia se ubicaron entre los obtenidos para Q y QAG, lo que probaría que la presencia de AG generó una disminución de la esta propiedad.

Tabla 3.I.4. Propiedades ópticas de las distintas películas formuladas a base de quitosano

Propiedades de las películas	Transparencia ($Abs_{600} \text{ mm}^{-1}$)*	Opacidad ($AU \text{ nm}^{-1}$)	Barrera al UV ($AU \text{ nm}^{-1}$)
Q	1,36 (0,03) ^a	24,3 (0,1) ^{a,b}	77,2 (2,7) ^a
QAG	7,17 (0,23) ^d	31,7 (3,7) ^d	159,9 (8,4) ^c
QN_A1:0,5	5,02 (0,21) ^c	32,4 (3,7) ^d	129,5 (1,6) ^b
QN_A 1:1	4,90 (0,07) ^c	28,8 (0,60) ^{c,d}	153,7 (7,3) ^c
QN_A1:2	4,75 (0,22) ^c	28,4 (0,7) ^{c,d}	205,5 (12,8) ^d
QN_B1:0,5	3,60 (0,58) ^b	32,0 (0,7) ^d	113,5 (0,8) ^b
QN_B1:1	4,50 (0,50) ^b	26,0 (1,7) ^{b,c}	185,7 (5,0) ^d
QN_B1:2	5,20 (0,50) ^c	21,9 (3,2) ^a	184,1 (13,1) ^d

*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

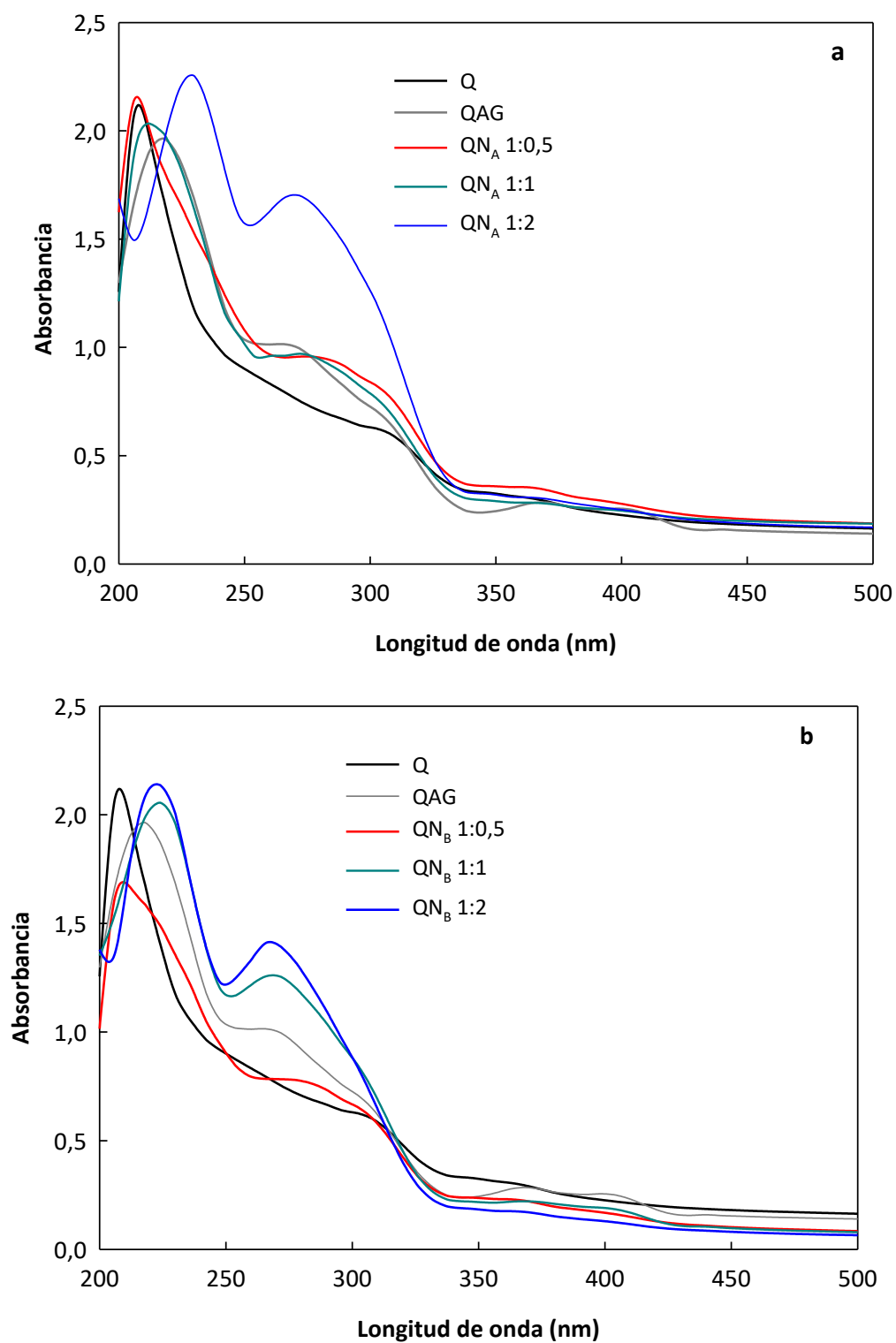


Figura 3.I.6. Espectros de absorción UV-visible de películas de: **a)** Q, QAG, QN_A 1:0,5, 1:1 y 1:2; **b)** Q, QAG, QN_B 1:0,5, 1:1 y 1:2.

En todos los espectros se evidenció el pico característico de absorción del anillo bencénico del AG, como se mencionó anteriormente. En particular las formulaciones con menor proporción de nanopartículas provocaron un corrimiento del pico hacia mayores longitudes de onda. Resultados similares fueron informados por Hu y col. (2015) quienes atribuyeron este desplazamiento a la interacción entre el quitosano y el ácido gálico. En los nanocompuestos con mayor proporción de nanopartículas, la localización del máximo de absorción coincidió con el de la película QAG (Figura 3.I.6). Estos resultados confirmarían la presencia de mayor cantidad de ácido gálico libre sin encapsular en el caso de las formulaciones con mayor proporción de nanopartículas.

En la Tabla 3.I.5 se resumen las propiedades de color de las distintas matrices nanocompuestas.

Tabla 3.I.5. Parámetros de color de las películas formuladas a base de quitosano

Parámetros de color	L*	b*	ΔE	IB	IP
Q	88,6 (1,5) ^a	21,8 (2,3) ^a	28,6 (4,3) ^a	76,4 (3) ^a	90 (10) ^a
QAG	57,2 (3,1) ^b	29,2 (1,4) ^c	61,2 (2,7) ^e	47,6 (2) ^b	508 (57) ^b
QN_A 1:0,5	71,2 (1,6) ^c	29,5 (0,4) ^c	47,6 (0,7) ^d	58,7 (1) ^c	264 (12) ^c
QN_A 1:1	74,4 (0,9) ^d	19,1 (1,5) ^a	41,7 (0,7) ^c	63,8 (0,7) ^e	259 (4) ^e
QN_A 1:2	76,4 (3,1) ^e	18,1 (1,1) ^a	39,3 (1,7) ^c	72,4 (4) ^a	111 (8) ^d
QN_B 1:0,5	67,1 (0,6) ^e	27,4 (0,5) ^{b,c}	42,4 (0,8) ^c	62,8 (2) ^d	204 (29) ^e
QN_B 1:1	66,5 (0,6) ^f	25,6 (0,7) ^b	35,5 (0,6) ^b	75,2 (4) ^a	126 (8) ^d
QN_B 1:2	65,9 (0,6) ^g	22,5 (1,2) ^a	34,4 (0,6) ^b	76,3 (0,5) ^a	121 (2) ^d

*Distintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05).

La incorporación de ácido gálico a las películas de quitosano generó una disminución en la luminosidad y blancura de las películas, exponiendo la reducción en el brillo de estas matrices causado por el compuesto activo. La disminución en este parámetro no resultó tan marcada en las películas nanocompuestas indicando que la mayor proporción del AG presente se encontraba encapsulado. Los valores del parámetro de cromaticidad b^* son una exteriorización de la proporción de amarillo en el material. Silva-Weiss y col. (2013) informaron cambios similares en el color de películas de quitosano y almidón, con y sin polifenoles. De acuerdo a Homez-Jara y col. (2018), la presencia de color amarillo en películas de quitosano es una característica intrínseca asociada a las unidades de β -(1-4)-2 amino-2-deoxi-D-glucopiranosas. Según Zhang y col. (2019) bajos valores de IB y altos valores de b^* estarían relacionados con una posible oxidación del ácido gálico. Estos resultados indicarían que la suspensión de nanopartículas incorporadas en la matriz de quitosano fue capaz de proteger al AG frente al proceso de oxidación. Este fenómeno confirmó que las diferencias observadas podrían ser explicadas en base a las interacciones entre el AG y el quitosano.

Estos resultados respaldaron las dilucidaciones realizadas sobre los espectros UV-visible de las diferentes películas. Por el contrario, Kaur y col. (2017) observaron que el agregado de nanopartículas de ZnO no generó cambios en los parámetros de color de películas de quitosano y almidón.

Por otra parte, el índice de pardeamiento (IP) se relaciona con la cantidad de luz que puede pasar a través de un envase, dificultando así el deterioro de un alimento por acción de la luz si los valores de IP son altos (Martins y col., 2012). La inclusión directa del AG en la matriz generó un significativo aumento del IP ($p < 0,05$) atribuible a un posible proceso de oxidación del compuesto activo, en tanto que se observó una disminución con el agregado de nanopartículas con respecto a QAG, confirmando la protección conferida al compuesto por la encapsulación.

3.1.3.6 Propiedades mecánicas

Analizando el comportamiento mecánico, los resultados del ensayo de tensión permitieron determinar que el esfuerzo a la ruptura de las películas funcionalizadas con AG fueron superiores a las de Q control mientras que la elongación experimentó una reducción debido al refuerzo de la matriz polimérica producto del entrecruzamiento del compuesto activo con Q, según se observa en la Tabla 3.I.6 o en los perfiles mecánicos presentados en la Figura 3.I.7. Estos resultados podrían ser atribuidos a la formación de enlaces intermoleculares de tipo puente de hidrógeno entre las cadenas de Q y los grupos -OH del ácido gálico (Sun y col., 2011), que restringirían la movilidad molecular de la matriz polimérica. Una tendencia similar fue informada por Orliac y col. (2002) trabajando con películas de proteínas de girasol entrecruzadas obtenidas por termo-compresión.

En el caso de QN_A 1:0,5, el esfuerzo alcanzó un valor máximo de 33 MPa y la elongación un 26%, mientras que para la película QN_B 1:0,5, ambos parámetros no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con relación a las películas Q (Figura 3.I.7) y Tabla 3.I.6.

Tabla 3.I.6. Propiedades mecánicas de las distintas matrices estudiadas

Muestra	Esfuerzo a la ruptura (MPa)	Elongación %	Tenacidad (J)
Q	24 (0,8) ^a	18 (3) ^a	0,12 (0,03) ^b
QAG	32 (0,2) ^b	10 (3) ^b	0,16 (0,07) ^c
QN _A 1:0,5	33 (3) ^b	26 (5) ^c	0,26 (0,06) ^d
QN _A 1:1	34 (3) ^b	15 (0,8) ^d	0,10 (0,02) ^a
QN _A 1:2	45 (3) ^c	8 (1) ^b	0,10 (0,04) ^a
QN _B 1:0,5	26 (3) ^a	19 (2) ^a	0,20 (0,03) ^c
QN _B 1:1	51 (4) ^d	8 (1) ^d	0,10 (0,04) ^a
QN _B 1:2	48 (3) ^c	10 (0,6) ^d	0,11 (0,05) ^a

*Subíndices distintos en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

En este punto vale la pena destacar que las suspensiones con TPP representaron sólo la tercera parte de la totalidad del sistema QN 1:0,5 ya que la mayor parte de la matriz soporte

estaba formada por Q no entrecruzado. Es decir, si bien el TPP juega un rol como agente reticulante en el nanocompuesto QN_A con una relación Q:TPP equivalente a 5 (menor proporción de TPP) se observaron cambios significativos en la elongación del material. El aumento de la elongación de las matrices $QN_{A,B}$ 1:0,5 y QN_A 1:1 probaría que las nanopartículas tienen efecto plastificante sobre las películas.

Con el agregado de mayores proporciones de nanopartículas se observó un aumento en los valores de esfuerzo y una consecuente disminución en la elongación de los materiales. De acuerdo con Hosseini y col. (2015), este comportamiento podría explicarse considerando la reducción en el volumen libre causado por un incremento en las fuerzas de atracción obteniéndose una red polimérica de alta densidad. En las Figuras 3.I.7 a y b se muestran los perfiles mecánicos de los distintos nanocompuestos.

La compatibilidad entre la matriz de quitosano y la fase dispersa de nanopartículas llevarían al aumento en los valores de tensión observados. Bonilla y col. (2013) trabajando con matrices de ácido poliláctico (PLA) y partículas de quitosano informaron una disminución en los valores de esfuerzo con el aumento de contenido de partículas, atribuyendo este resultado a la formación de agregados entre las partículas inmersas en la matriz de PLA y a una baja compatibilidad entre los polímeros.

Asimismo, cabe aclarar que los valores de esfuerzo más altos se registraron con las formulaciones que contenían mayor proporción de suspensión de nanopartículas, lo que podría explicarse en base a la presencia de ácido gálico libre (como se mencionó en la sección *Propiedades ópticas de las películas*) que generaría un efecto de entrecruzamiento con el Q y un refuerzo adicional al de las nanopartículas.

Analizando los valores de tenacidad, se pudo observar que el agregado de AG generó un aumento en el valor de la misma. Mientras tanto, la inclusión de nanopartículas en menores proporciones también produjo un aumento en la tenacidad, mostrando una mayor influencia la formulación con partículas de mayor tamaño (N_A) con respecto a NB ($p < 0,05$). Por último, el agregado de mayores cantidades de suspensión condujo a una disminución en la tenacidad de los nanocompuestos desarrollados con ambas formulaciones en base a que proporcionalmente la elongación del material disminuyó más que el aumento del esfuerzo.

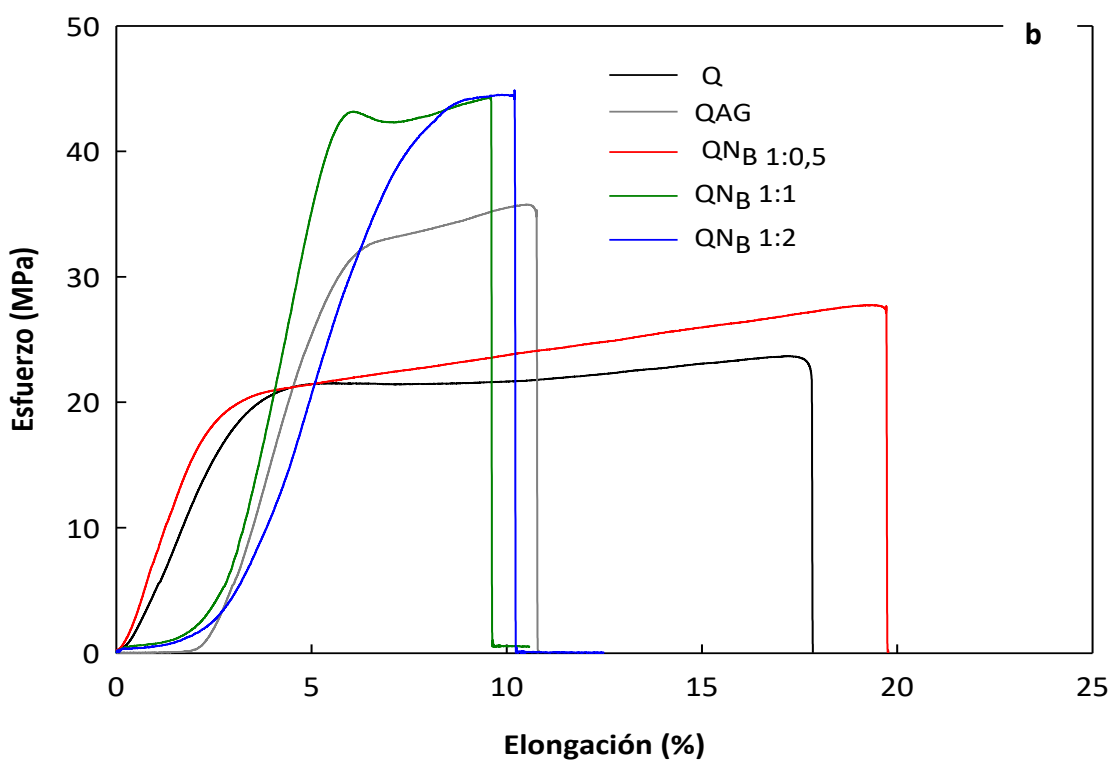
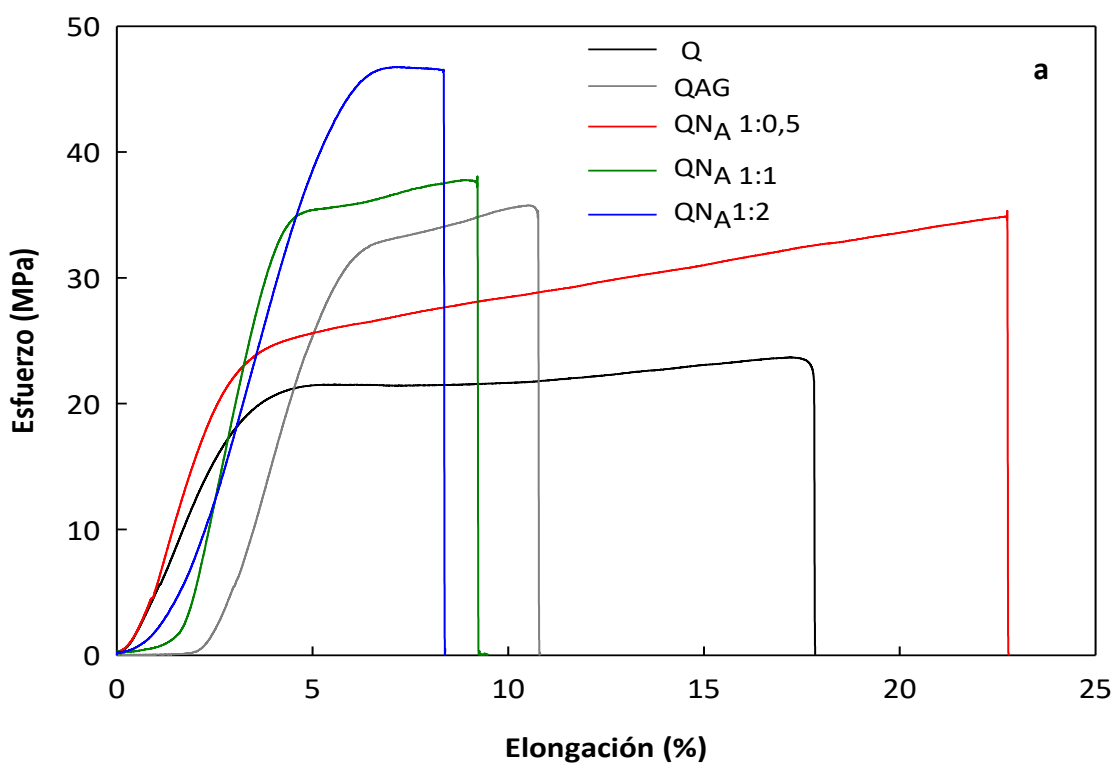


Figura 3.I.7. Perfiles mecánicos de las películas de Q, QAG y nanocompuestos: **a)** QN_A 1:0,5, 1:1 y 1:2; **b)** QN_B 1:0,5, 1:1 y 1:2.

3.I.4.7 Propiedades antimicrobianas de las películas nanocompuestas

Las Tablas 3.I.7, 3.I.8, 3.I.9 y 3.I.10 muestran el efecto antimicrobiana de las película de quitosano, QAG y nanocompuestos frente a *E.coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, y *Candida vinaria*.

La actividad antibacteriana del quitosano es compleja y difiere entre bacterias *Gram-positivas* y *Gram-negativas* debido a la diferencia en la composición de la superficie celular de ambos tipos de bacterias. Distintos mecanismos han sido propuestos por diversos autores (Romainor y col., 2014) para explicar la actividad antimicrobiana, considerando que la interacción electrostática del quitosano se produciría: (i) con grupos cargados negativamente presentes en los componentes de la membrana celular (fosfolípidos y proteínas), (ii) con aminoácidos localizados en la pared celular de las bacterias *Gram-positivas*, o (iii) con los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias *Gram-negativas*, afectando la integridad y la permeabilidad de la membrana.

Los ensayos de capacidad inhibitoria de las películas frente a *E. coli* confirmaron las propiedades antimicrobianas del quitosano presentando un porcentaje de inhibición del 68 % (Tabla 3.I.7)

La película QAG en contacto con el medio de cultivo mostró menor actividad antimicrobiana frente a *E. coli* respecto a la película control Q ($p < 0,05$), lo cual podría deberse a una interferencia producida por la interacción entre el AG y el quitosano, en tanto que sólo la inclusión de nanopartículas N_B en altas proporciones generó un aumento en la capacidad antimicrobiana. Una tendencia similar fue observada por Romainor y col. (2014) quienes establecieron una correlación entre la capacidad antimicrobiana y el contenido de nanopartículas de quitosano. Los autores remarcaron que el incremento del contenido de nanopartículas aumenta la cantidad de sitios con mayor superficie específica llevando a que la unión polímero-bacteria sea más lábil (Abdelgawad y col., 2014). Por otra parte,






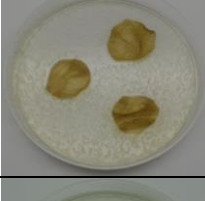


Paomephan y col. (2018) observaron que al reducir el tamaño de nanopartículas de quitosano aumentó la capacidad antimicrobiana de las mismas frente a *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Este comportamiento explicaría la mayor capacidad antimicrobiana de las nanopartículas N_B de menor tamaño incluidas en la matriz de Q, con respecto a las nanopartículas N_A (Tabla 3.I.7 y 3.I.8).

Asimismo, la película de quitosano control presentó actividad antibacteriana frente a *Salmonella* spp. El agregado de AG produjo un aumento en la inhibición del desarrollo microbiano. De acuerdo a Borges y col. (2013), la capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos está relacionada al número de grupos -OH disponibles y al aumentar la hidroxilación aumenta la capacidad antimicrobiana.

Los nanocompuestos $QN_{A,B}$ en las proporciones 1:2, así como las películas QN_B 1:1 presentaron capacidad de formar halo probablemente debido a la presencia de AG libre en la superficie de las nanopartículas, que podría ser liberado durante las primeras 24 horas hacia el medio de cultivo. Sun y col. (2014) postularon la existencia de un efecto sinérgico entre el quitosano y AG para explicar el aumento del efecto inhibitorio frente a *Salmonella typhimurium*. La capacidad antimicrobiana de los nanocompuestos QN_B frente a *Salmonella* spp. fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la de QN_A (Tabla 3.I.8).






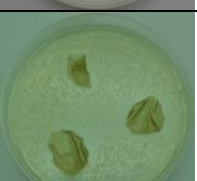
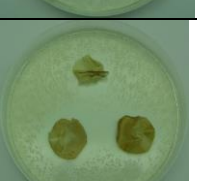

Considerando los ensayos frente a *S. aureus*, el porcentaje de inhibición exhibió un valor significativamente inferior al presentado frente a otros microorganismos ($p < 0,05$). Es necesario señalar que todas las formulaciones QN_B no exhibieron halo, pero inhibieron el desarrollo del microorganismo por contacto (Tabla 3.I.9). Este comportamiento podría deberse a la diferencia estructural entre los microorganismos estudiados ya que *E. coli* y *Salmonella* spp. son bacterias *Gram-negativas* y *S. aureus* es *Gram-positiva* (Ramos y col., 2012). Este efecto dispar también fue observado por Kalwar y col. (2016) al analizar las propiedades antimicrobianas de membranas de nanofibras compuestas de quitosano y policaprolactona.

Tabla 3.I.7. Inhibición (%) de las películas frente a 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹ de *E. coli*

Formulación	Inhibición (%)	Foto
Q	68 (4) ^d	
QAG	25 (0,7) ^a Inhibición por contacto	
QN _A 1:0,5	35(0,7) ^b	
QN _A 1:1	28 (1) ^a Inhibición por contacto	
QN _A 1:2	25(2) ^a Inhibición por contacto	
QN _B 1:0,5	35 (0,3) ^b	
		
QN _B 1:2	61 (0,8) ^c	









*Superíndices diferentes indican muestras estadísticamente diferentes (p<0,05).

Tabla 3.I.8. Inhibición (%) de películas frente a 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹ of *Salmonella* spp

Formulación	Inhibición (%)	Foto
Q	50 (1) ^c	
QAG	48 (2) ^c	
QN _A 1:0,5	27 (1) ^a Inhibición por contacto	
QN _A 1:1	25 (3) ^a Inhibición por contacto	
QN _A 1:2	76 (6) ^b	
QN _B 1:0,5	28 (2) ^a	
QN _B 1:1	33 (3) ^b	
QN _B 1:2	45 (3) ^b	

*Superíndices diferentes indican muestras estadísticamente diferentes (p<0,05).

Tabla 3.I.9. Inhibición (%) de películas frente a 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹ de *S. aureus*

Formulación	Inhibición (%)	Foto
Q	53 (7) ^d	
QAG	51 (1) ^d	
QN_A 1:0,5	30 (1,0) ^c	
QN_A 1:1	25 (0,5) ^b Inhibición por contacto	
QN_A 1:2	25 (0,4) ^b Inhibición por contacto	
QN_B 1:0,5	24 (0,7) ^b Inhibición por contacto	
QN_B 1:1	25 (0,8) ^b Inhibición por contacto	
QN_B 1:2	25 (0,2) ^a Inhibición por contacto	

*Superíndices diferentes indican muestras estadísticamente diferentes (p<0,05).








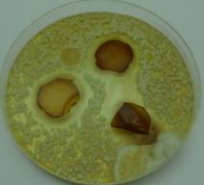
Por otra parte, la evaluación de la capacidad antifúngica de las distintas películas se llevó a cabo frente a *Candida vinaria*. En la Tabla 3.I.10 se resumen los resultados observados.

Como puede verse en la Tabla 3.I.10, el quitosano exhibió capacidad antifúngica ejerciendo su efecto inhibitorio por contacto y por difusión, generando un halo e indicando que el medio del agar es propicio para su acción antifúngica por solubilización parcial del polímero (Lemes y col., 2018).

De acuerdo a Rabea y col. (2003) y Dutta y col. (2009) el quitosano posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana, presentando acción inhibitoria frente al desarrollo de diferentes hongos y levaduras, bacterias *Gram-positivas* y *Gram-negativas*. En el caso de los hongos, este polímero ejerce una efecto antifúngico inhibiendo la formación de esporas e hifas (Hernández-Lauzardo y col., 2008). Luego de la lisis celular, el quitosano puede unirse y desnaturalizar enzimas además de inhabilitar el ADN y reprimir la síntesis de ARN mensajero, lo cual dificulta la esporulación del microorganismo fúngico (Valencia, 2015).

El agregado de ácido gálico mejoró la capacidad antifúngica de las películas de quitosano. De acuerdo a Latanzio y col. (2006) el ácido gálico inhibe la germinación y la esporulación de diferentes tipos de hongos. Por otra parte, la presencia de nanopartículas en mayores proporciones en las formulaciones QN_B 1:1 y 1:2 generó una disminución en la capacidad antifúngica frente a *Candida vinaria*. Este fenómeno tendría fundamento en la menor capacidad de difundir del AG al aumentar el grado de entrecruzamiento de la matriz con menor capacidad de hinchamiento disminuyendo su capacidad antimicrobiana (Lamarra y col., 2017).

Tabla 3.I.10. Inhibición (%) de películas frente a 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹ de *Candida vinaria*

Formulación	% de inhibición	Foto
Q	63 (7) ^{a,b}	
QAG	76 (2) ^b	
QN _A 1:0,5	71(1) ^b	
QN _A 1:1	80 (1) ^{b,c}	
QN _A 1:2	78 (2) ^b	
QN _B 1:0,5	75 (2) ^b	
QN _B 1:1	47 (2) ^a	
QN _B 1:2	51 (3) ^a	

*Superíndices distintos indican muestras estadísticamente diferentes (p<0,05)

3.1.4. Conclusiones

Se sintetizaron películas nanocompuestas utilizando como matriz el quitosano la cual se le adicionaron distintas proporciones de nanopartículas activas. La inclusión de estas nanopartículas produjo modificaciones en las propiedades de barrera, más específicamente disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua. Otros cambios detectables se produjeron a nivel de absorción de radiación en la región ultravioleta del espectro, debido a la presencia del ácido gálico.

La presencia de mayores proporciones de partículas llevó a un aumento en los valores del esfuerzo y una disminución de la elongación como resultado del entrecruzamiento de la matriz.

Los nanocompuestos presentaron una capacidad antibacteriana equivalente a la del quitosano cuando se incluyeron nanopartículas en bajas proporciones en tanto que el agregado de mayor cantidad de partículas produjo un aumento en la inhibición. Este comportamiento se explicó teniendo en cuenta que estas matrices experimentaron un menor grado de hinchamiento y fue particularmente marcado frente a bacterias *Gram-positivas*.

La inclusión de nanopartículas produjo una mejora en propiedades asociadas a la conservación de alimentos, lo cual representa una ventaja tecnológica para su potencial aplicación como envases activos.

PARTE II

3.II.1 Introducción

La aplicación de aditivos o compuestos activos en forma directa sobre la superficie del alimento, como ocurre en el caso de los recubrimientos o en los tratamientos por inmersión puede provocar una neutralización o una rápida difusión al producto, disminuyendo su eficacia por el breve tiempo de contacto. Como una alternativa para aumentar la efectividad de numerosos ingredientes surgen los sistemas de liberación controlada. Sus inicios se enmarcan en el desarrollo de la industria farmacéutica; no obstante hoy en día, sus usos se han extendido a áreas como el desarrollo de agroquímicos, fertilizantes, drogas, así como en la industria alimentaria (Mastromatteo y col., 2010). La liberación controlada puede ser definida como el método por el cual uno o más ingredientes o agentes activos son accesibles en un sitio, en un tiempo y a una velocidad específica.

En los últimos años, se han desarrollado métodos novedosos para el diseño de micro y nanosistemas transportadores de principios activos como compuestos antioxidantes y antimicrobianos tales como el ácido gálico. Estas estructuras permiten la liberación controlada de los componentes activos con distintos propósitos (Lamarra y col., 2017; Robert y col., 2012). Se han ensayado procesos de liberación controlada de micro y nanopartículas de distinto origen ya sea quitosano (Ahmadi y col., 2014; Hasheminejad y col., 2019; Valente y col., 2013; Yoksan y col., 2010), nanoliposomas (Jose y col., 2018), nanopartículas lipídicas (Gou y col., 2018; Shtay y col., 2019), *scaffolds* (Sahmani y col., 2018), materiales híbridos 3D (Gutierrez-Pineda y col., 2018), entre otros.

Para que el proceso de liberación controlada pueda llevarse a cabo es posible modificar parámetros tales como humedad, temperatura, pH y/o ruptura mecánica de las cápsulas (Figura 3.II.1).

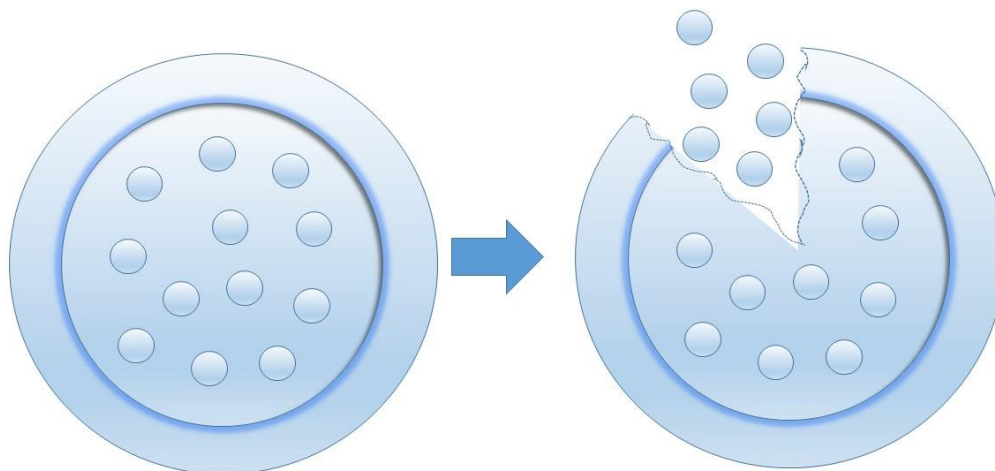


Figura 3.II.1. Esquema representativo de ruptura de cápsulas liberando el compuesto activo (Augustin y Hemar, 2009).

El envase de liberación controlada es un término relativamente nuevo que aparece en bibliografía en 2005 (LaCoste y col., 2005). Si bien existían los envases activos antimicrobiano y antioxidante, la idea fue desarrollar y promover la aplicación del envase como un sistema para controlar la liberación de compuestos activos a fin de mejorar la seguridad alimentaria y la calidad del producto. El envase de liberación controlada (ELC) puede implicar liberación de antimicrobianos y antioxidantes así como otros compuestos activos incluyendo sabores, aromas y hormonas de crecimiento de plantas. La investigación se centra en sistemas de liberación, con énfasis en la comprensión en profundidad del mecanismo y la cinética de los compuestos activos que libera el envase. Sin embargo, el análisis es más general; no sólo implica los sistemas de liberación, sino también los de no-liberación antimicrobianos o antioxidantes tales como los injertados en materiales de envases, así como los sistemas no-liberadores como absorbedores de oxígeno y de radicales libres (Arrua y col., 2010; Gómez-Estaca y col., 2014; Moudache y col., 2016; Moudachey col., 2017; Nerín, 2010; Pezo y col., 2008).

Además de compuestos activos simples, las combinaciones de dos o más compuestos activos también pueden utilizarse. Un sistema ELC puede estar funcionalizado con dos

agentes antimicrobianos capaces de inhibir el desarrollo de diferentes microorganismos (Lee y col., 2003), o puede estar activado con antimicrobianos y antioxidantes (Lee y col., 2004).

La liberación de compuestos activos de una matriz polimérica usada como envase implica tres pasos:

(1) difusión molecular dentro de la película hacia la interfase película/sustrato, (2) transferencia de masa a través de la interfase y (3) dispersión en el sustrato o desorción en el espacio de cabeza del envase (Lee y col., 2008). En bibliografía, la difusión en la película se supone que es el paso más lento y la etapa determinante de la velocidad.

Los modelos matemáticos más usados para describir el comportamiento de liberación derivan de ecuaciones basadas en la difusión (Fickiana) con condiciones iniciales y de contorno apropiados (Chen y col., 2018)

En forma similar, la ecuación de Korsmeyer–Peppas puede usarse para determinar el mecanismo de liberación. Este modelo permite que la cinética sea estimada mediante el valor del exponente de difusión n . Valores de $n=0,5$ indican una difusión Fickiana, o liberación del compuesto activo controlada por difusión, como en el Modelo de Higuchi. Si el exponente está en el rango $0,5 < n < 1$, indica una difusión anómala, o liberación del compuesto controlada tanto por difusión como por erosión. Si $n=1$, indica transporte caso II, o liberación de orden cero, donde la velocidad de liberación es constante y controlada por la relajación del polímero. Finalmente, cuando $n > 1$, indica transporte súper caso II, o liberación controlada por erosión.

La liberación controlada desde los envases activos antimicrobianos/antioxidantes transfiriendo el agente antimicrobiano/antioxidante desde el polímero portador al alimento permite mantener una concentración constante durante un período de tiempo determinado. En la mayoría de los casos, en las matrices altamente hidrofílicas, el proceso de hinchamiento o incorporación de agua desencadena el proceso de liberación del principio activo.

Por su parte, Karbowiak y col. (2010) plantearon que en sistemas para alimentos los mecanismos de difusión se corresponden con los fenómenos de transporte en sólidos; en sistemas porosos con la presencia de poros y canales, mientras que en sistemas densos se

asume la ley de Fick. En aquellos sistemas en donde no hay reacción química entre los componentes, asumieron que la transferencia de masa se debe no sólo a la difusión browniana sino que también incluye el fenómeno de convección y las fuerzas de capilaridad, entre otras. Aquí el agua juega un papel muy importante, no solo como disolvente, sino que puede producir cambios en la matriz polimérica y modificar la difusión de la sustancia, sobre todo de las que tienen más afinidad con ella. Al ponerse en contacto la matriz con un medio fluido (agua o medios fisiológicos) la matriz comienza a hincharse y puede tener lugar la disolución del compuesto activo (para polímeros con una temperatura de transición vítrea superior a la temperatura ambiente). El hinchamiento implica la transición de un estado vítreo a un estado gomoso y cuando la cantidad de líquido supera un valor umbral, las cadenas de polímeros se despliegan y como consecuencia de la transición antes mencionada, una capa tipo gel comienza a aparecer rodeando la matriz núcleo.

Teniendo en cuenta estas premisas, los objetivos del presente Capítulo fueron:

- Estudiar la influencia de las relaciones Q:TPP y Q:N sobre la movilidad molecular y las propiedades microestructurales de las películas a través de las técnicas de ATR-FTIR, DRX, SEM y PALS
- Evaluar el comportamiento térmico de los nanocompuestos mediante el uso de calorimetría diferencial de barrido (MDSC)
- Correlacionar la variación observada en los procesos de transición térmica con los parámetros obtenidos mediante la técnica de PALS
- Modelar matemáticamente la cinética de liberación del ácido gálico mediante modelos que tengan en cuenta las diferentes fases del proceso. Interpretar los parámetros teniendo en cuenta que la dosificación del compuesto activo puede llevarse a cabo mediante diferentes mecanismos

3.II.2. Materiales

Los estudios se efectuaron sobre los mismos materiales usados en la *Parte I* del presente *Capítulo*.

3.II.3 Métodos

3.II.3.1 Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido, permite estudiar la microestructura de las películas y sistemas desarrollados, formando la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de rastreo.

La evaluación de la morfología de las películas se realizó a través del uso de un microscopio electrónico de barrido FEI modelo Quanta 200 (The Netherlands) en modo bajo vacío. Previo al análisis, las películas Q, QAG y las matrices nanocompuestas QN_A y QN_B se fracturaron por inmersión en nitrógeno líquido y se montaron en tacos de bronce a través de una cinta doble faz de carbón. Los especímenes fueron examinados sin la adición de recubrimientos conductores a un voltaje de aceleración de 15 kV.

Adicionalmente, las fallas mecánicas producidas en las muestras sometidas a tracción, se analizaron por observación microscópica de la sección transversal donde se produjo la fractura de las muestras.

3.II.3.2 Análisis por ATR-FTIR

Dado que la técnica fue presentada en el *Capítulo 1* sólo se describirán los detalles adicionales de las técnicas usadas para el análisis de los espectros obtenidos.

Teniendo en cuenta que la posición exacta de los picos de los espectros FTIR de las muestras no aparece bien definida, se recurrió a herramientas matemáticas como la derivada segunda o la deconvolución para mejorar la resolución espectral. La deconvolución espectral de los picos ubicados en la región comprendida entre 1700 cm⁻¹ y 1500 cm⁻¹ correspondiente

a las bandas de amida I y amida II del quitosano, se realizó por medio de algoritmos de ajuste de curvas mediante la función gaussiana. La inversa de la segunda derivada de los espectros fue utilizada para obtener el número, la posición y la contribución relativa de los componentes individuales de la amida I y la amida II.

3.II.3.3 Espectroscopía de tiempo de vida media de aniquilación de positrones (PALS)

La espectroscopía de aniquilación de positrones en el modo de medición de vidas medias (PALS) es una técnica versátil que permite el estudio de distintos tipos de materiales a nivel nanoestructural: metales, semiconductores, polímeros, entre otros. Esta técnica permite obtener información sobre la densidad electrónica y la existencia de defectos de tamaño atómico y nanométrico tales como vacancias, aglomerados de vacancias o nanohuecos donde se produce la aniquilación del positrón. En el caso de materiales donde existe probabilidad de formación de positronio también es posible obtener información sobre el tamaño de las cavidades del material. Asimismo, la técnica de PALS posibilita la identificación y caracterización de cada uno de estos defectos siendo posible obtener información experimental detallada de la estructura electrónica y atómica de la región estudiada.

Por otra parte, variando la energía de implantación de los positrones es posible explorar zonas de la muestra que van desde unos pocos nanómetros de profundidad hasta llegar a varios micrones. Los positrones, una vez que penetran en la muestra, reducen drásticamente su energía llegando a energías del orden de las térmicas, de unos pocos picosegundos. Una vez frenado, el positrón se difunde hasta que se aniquila con un electrón del medio. Para cada energía de implantación, una fracción de los positrones difunde hacia la superficie de la muestra, otra fracción se aniquila en un estado de *bulk* mientras que el resto es atrapado en defectos de volumen abierto tipo-vacancia para posteriormente aniquilarse (Macchi, 2013).

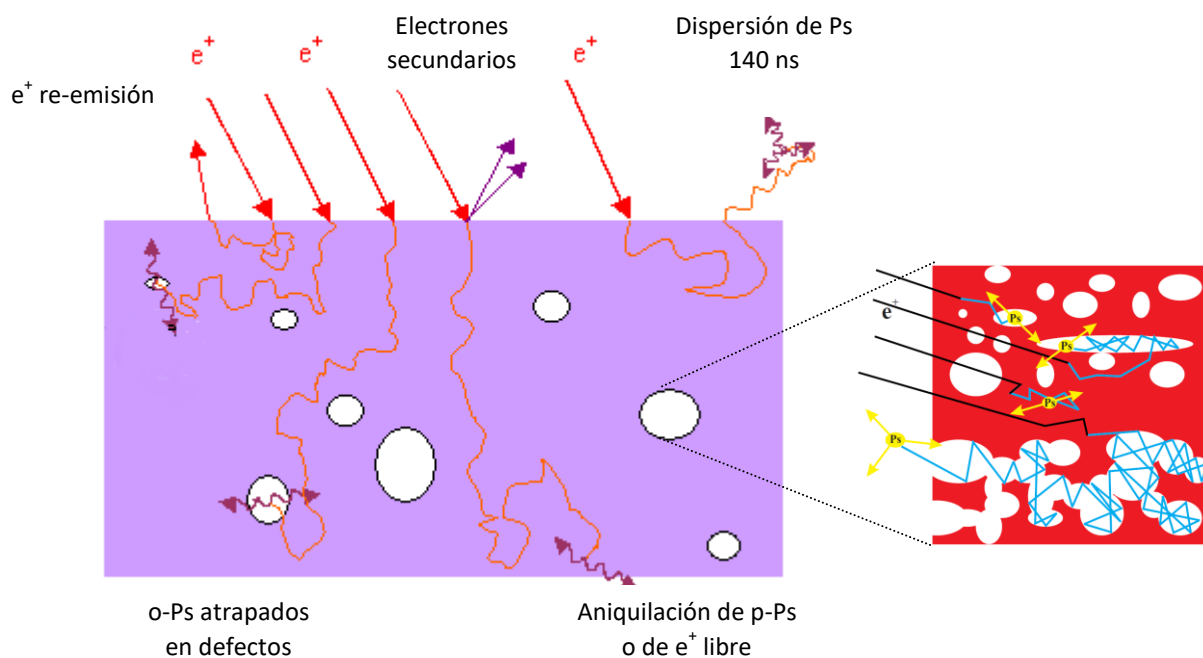


Figura 3.II.2. Esquema representativo de las interacciones de positrón y positronio Ps con la materia condensada. <http://positrons.physics.lsa.umich.edu/nanopos/PALS-intro/PALS%20basics.htm> Y <https://www.nist.gov/laboratories/tools-instruments/positron-annihilation-lifetime-spectrometer>

Los positrones que se difunden hacia la superficie de la muestra tienen una alta probabilidad de formar un estado ligado con un electrón de la superficie que se denomina positronio (Ps) y ser re-emitidos hacia el vacío. Además, si en los materiales hay defectos de mayor tamaño tales como nanohuecos o poros, el positrón atrapado en el defecto también puede capturar un electrón del medio y formar Ps . El Ps se puede formar en dos estados de espín: el estado triplete, orto-positronio ($o-Ps$) con una probabilidad de formación de $3/4$ y el estado singlete, para-positronio ($p-Ps$) con una probabilidad de formación de $1/4$ (Macchi, 2013).

El tiempo de vida del positrón es inversamente proporcional a la densidad local electrónica. Como consecuencia, el tiempo de vida aumenta cuando un positrón es atrapado en un defecto tipo-vacancia, siendo su valor mayor a medida que aumenta el tamaño del

defecto. Cuando el volumen del defecto alcanza tamaños típicos del orden del nanómetro, se puede formar Ps.

La vida media de autoaniquilación del o-Ps en el vacío aparece como un sensor adecuado para medir el tamaño de una cavidad (vacía) en un medio material. La probabilidad por unidad de tiempo de un proceso *pick off* va a depender de las dimensiones de la cavidad. Se han propuesto modelos que relacionan la vida media del o-Ps en una cavidad con el radio de la misma. En este sentido la técnica resulta útil para poros menores que 1 nm

En el modelo de Tao- Eldrup se asume que el o-Ps está confinado dentro de una esfera rígida de radio R_0 . En la pared de la esfera hay una nube electrónica de espesor $R_0 - R_1$. Según este modelo, la expresión general que correlaciona la vida media del o-Ps (τ /ns) y la dimensión promedio de la cavidad ($R/\text{\AA}$) donde se aniquila se presenta en la Figura 3.II.3:

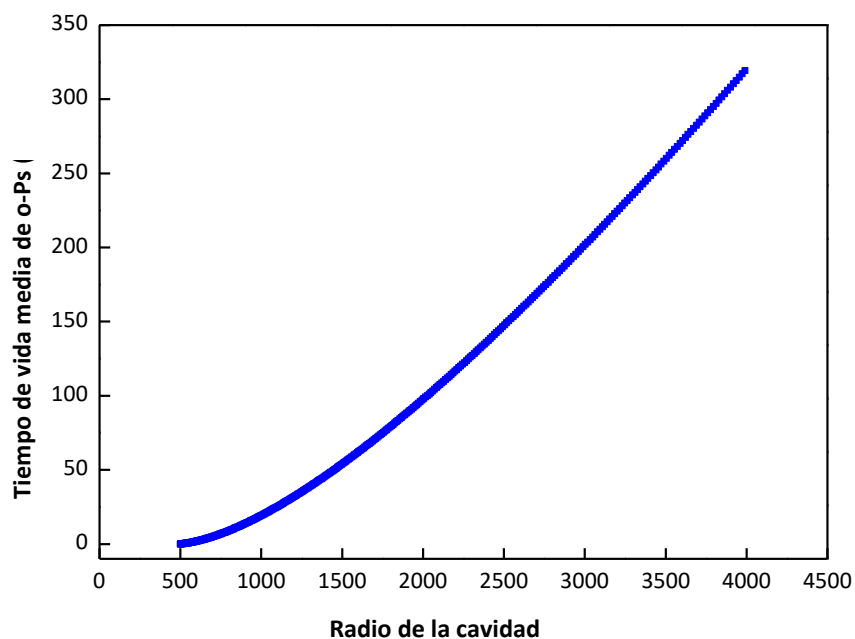


Figura 3.II.3. Representación gráfica del modelo de Tao-Eldrup.

Para los ensayos, se utilizaron especímenes circulares con un espesor en el rango 1,3-1,5 mm para asegurar la aniquilación de los positrones, los cuales se ubicaron en los extremos de

una fuente de ^{22}Na embebida en un alambre de Kapton. Los tiempos de vida media se cuantificaron empleando un sistema rápido-rápido de coincidencias convencionalmente utilizado en espectroscopía nuclear con dos detectores plásticos. El tiempo de resolución (definido como el ancho a mitad del máximo, FWHM) fue de 260 ps y se acumularon 3x60 cuentas luego de cada espectro (Rivero y col., 2016). Cada muestra se midió tres veces con un espectro de tiempo de vida individual teniendo 3×10^6 cuentas integradas. Del análisis se obtuvieron dos tiempos de vida discretos y uno continuo correspondiente al componente de vida larga. Este tiempo de vida larga da el tiempo de vida del orto-positronio (o-Ps) representado por una distribución continua de $1/\tau_3$. El espectro de tiempo de vida del positronio se analizó usando el programa POSITRONFIT dando las componentes discretas de tiempo de vida (τ_1 , τ_2 y τ_3). Usualmente la tercera componente de tiempo de vida (τ_3) está asociada con el radio de los sitios de volumen libre y la intensidad I_3 está vinculada con la concentración de estos sitios (Muramatsu y col., 2001; Peng y col., 2007).

3.II.3.4. Experimentos de difusión

El agente activo, ácido gálico, fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro UV-Visible DU 650 (Beckman, USA). La difusión del AG fue llevada a cabo en agua destilada a temperatura ambiente.

Especímenes de 6x6 cm se colocaron en soportes de plástico, se mantuvieron inmersos en 100 ml de solvente bajo agitación y a intervalos regulares de tiempo se tomaron 0,85 ml de muestra proveniente de la solución. La concentración de AG liberada desde la matriz hacia el medio se cuantificó por medidas de la absorbancia a 269 nm considerando el máximo de absorción del compuesto activo (*Capítulo 2, Sección 2.2*). Las curvas de calibración se construyeron con un patrón de ácido gálico solubilizado en el medio de liberación, agua. A partir de una solución madre de concentración $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ de AG, se realizaron diluciones sucesivas con el solvente y se midió la absorbancia a 269 nm. Todas las medidas se efectuaron por triplicado.

3.II.4 Resultados y discusión

3.II.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Resulta pertinente examinar la matriz desde el punto de vista de la microestructura. La técnica de SEM se utilizó para visualizar las secciones transversales y las características superficiales de las películas. El análisis microestructural indicó que la superficie de las matrices de quitosano fue lisa y uniforme, no presentando imperfecciones, poros o grietas, y revelando una estructura compacta. Resultados similares fueron informados por Rivero y col. (2014) para matrices a base de quitosano entrecruzadas con ácido ferúlico. La inclusión directa de AG no modificó la estructura de la matriz Q (Figura 3.II.4).

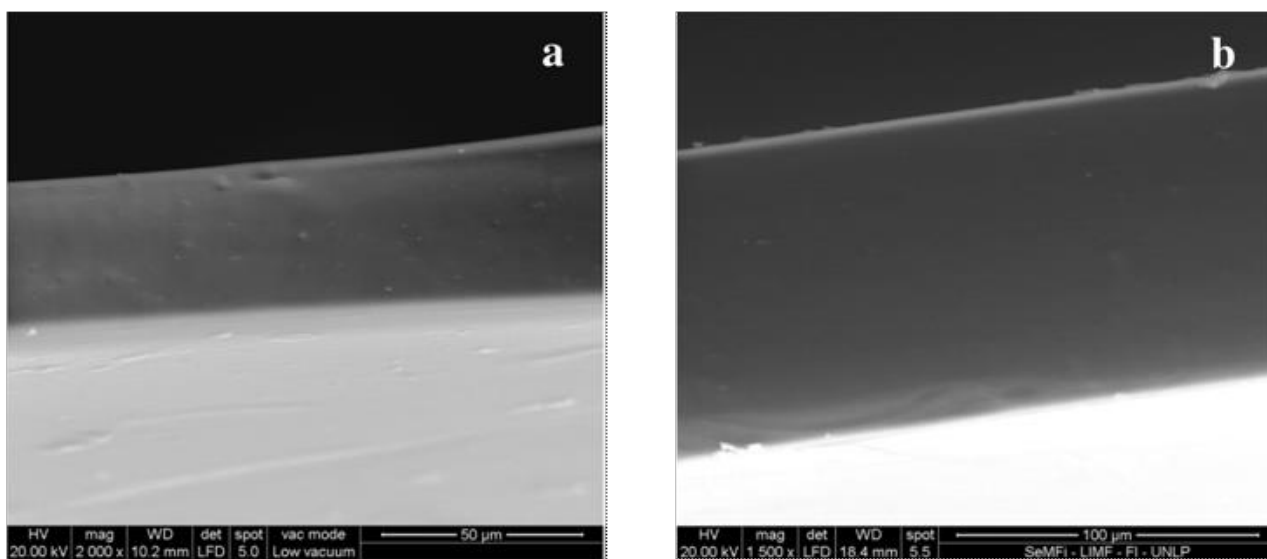


Figura 3.II.4. Micrografías obtenidas por SEM de las secciones transversales de películas: **a)** Q y **b)** QAG. Magnificación: 2000x y 1500x.

Por otra parte, la sección transversal de los nanocompuestos mostró una distribución homogénea de las partículas sin agregación sugiriendo la compatibilidad nanopartículas-matriz soporte (Figura 3.II.5). La incorporación de nanopartículas produjo cambios en la microestructura de las películas formando una matriz continua donde las partículas actuaron como fase de relleno (Figuras 3.II.5 a y b) independientemente de la relación Q:N. Estos resultados fueron consistentes con los encontrados por Teodoro y col. (2015) y Bhattacharya

(2016), quienes informaron que la distribución homogénea del relleno en la matriz Q mejora las interacciones causando una mayor y mejor adhesión entre las fases.

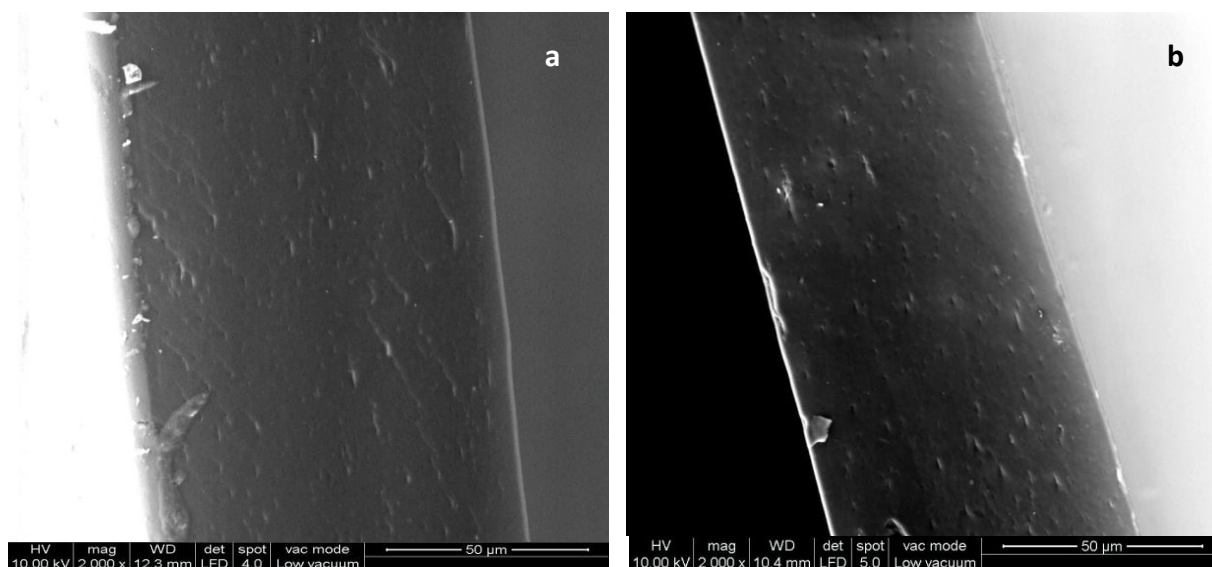


Figura 3.II.5. Micrografías SEM de las secciones transversales de las películas QN 1:0,5; **a)** QN_A y **b)** QN_B. Magnificación: 2000x.

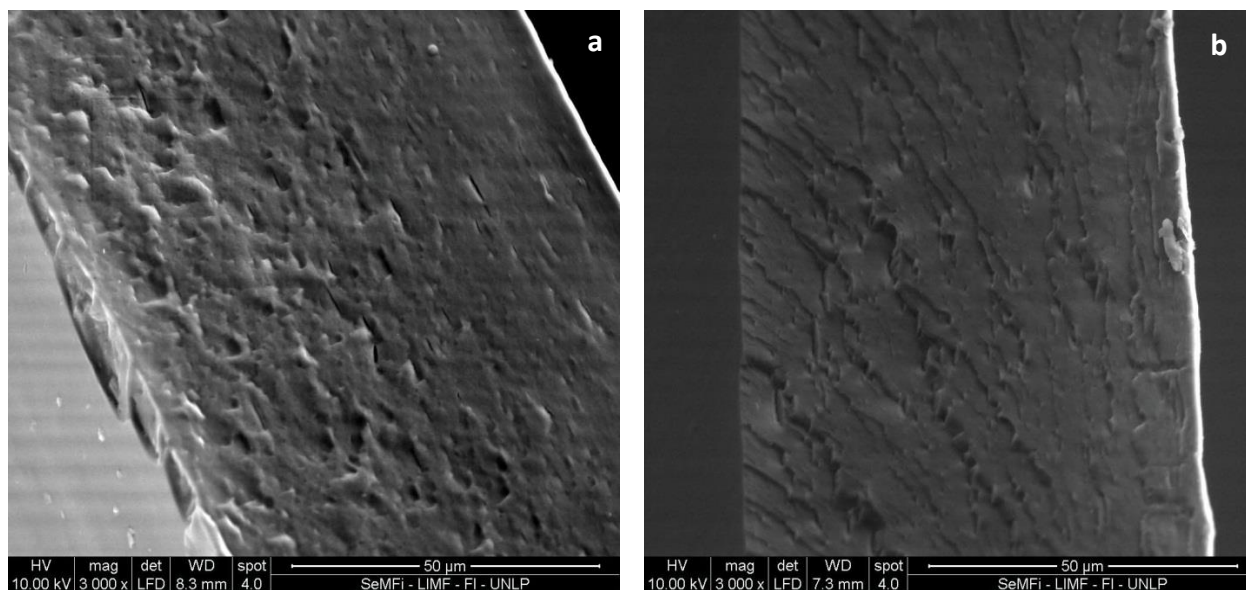


Figura 3.II.6. Micrografías SEM de las secciones transversales de las películas QN 1:1: **a)** QN_A y **b)** QN_B. Magnificación: 2000x.

Asimismo, las micrografías confirmaron el menor tamaño de las nanopartículas N_B incluidas en la matriz de quitosano con respecto a las N_A y la distribución uniforme de las mismas.

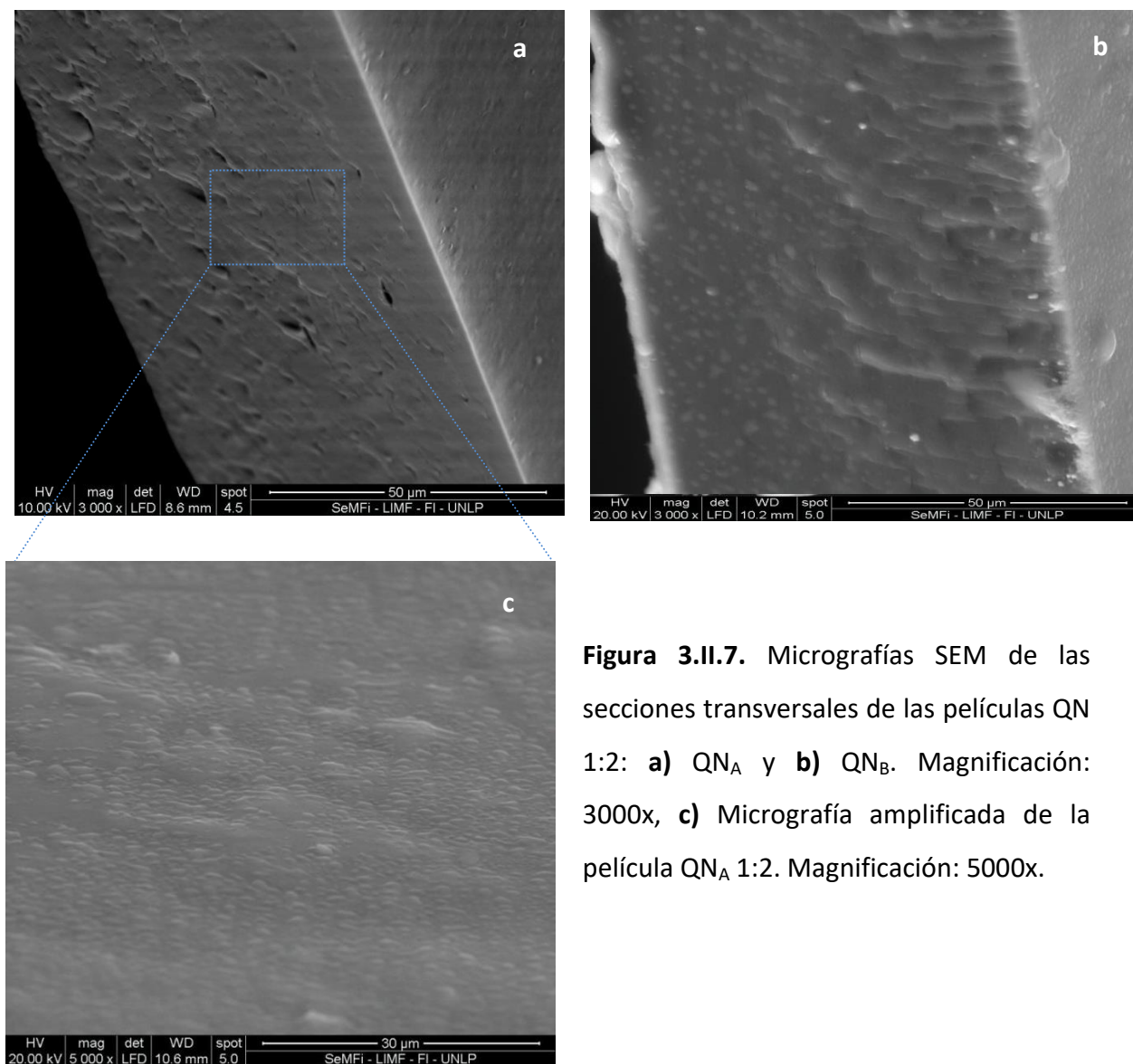


Figura 3.II.7. Micrografías SEM de las secciones transversales de las películas QN 1:2: **a)** QN_A y **b)** QN_B. Magnificación: 3000x, **c)** Micrografía ampliada de la película QN_A 1:2. Magnificación: 5000x.

De acuerdo a Ghazali y Haryondo (2013) la inclusión de partículas pequeñas permite obtener una distribución más homogénea de las mismas. La región ampliada de la película QN_A 1:2 muestra la dispersión de las nanopartículas en la matriz de quitosano (Figura 3.II.7 c). Estos resultados explican y se correlacionan con la disminución en la WVP informada en la

primera parte del presente *Capítulo 3* para los nanocompuestos con mayor proporción de nanopartículas (Hosseini y col., 2015).

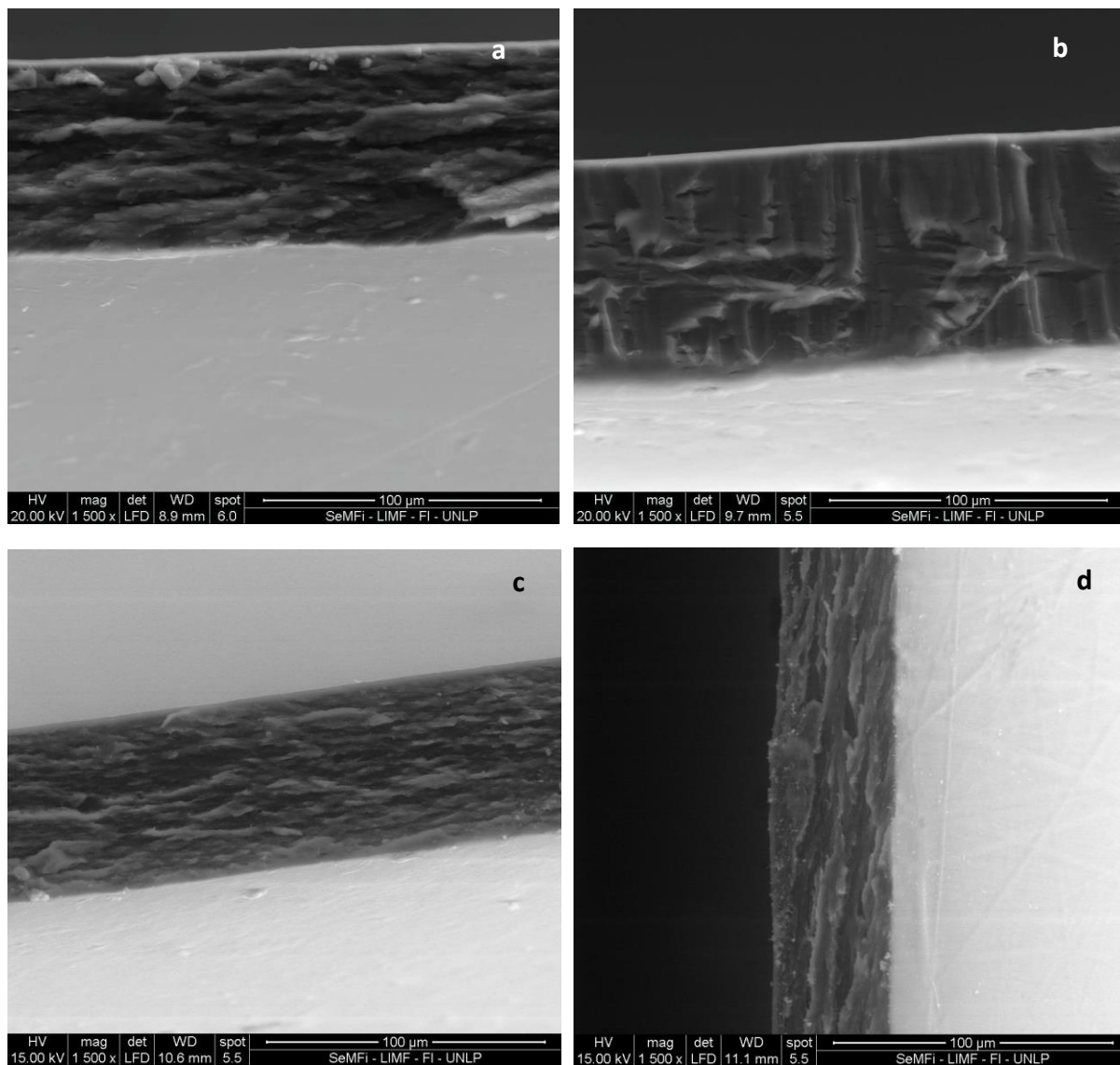


Figura 3.II.8. Micrografías obtenidas por SEM de secciones transversales de las películas sometidas a tracción: **a)** QN_A 1:0,5, **b)** QN_B 1:0,5, **c)** QN_A 1:1 y **d)** QN_B 1:1. Magnificación 1500x.

Por otra parte, la inspección microscópica de las muestras sometidas a ensayos de tracción permitió un análisis de la morfología de la región transversal donde el crecimiento de pequeñas fallas provocó la ruptura del material bajo la aplicación de una fuerza. La matriz mostró una alineación en dirección de la fuerza aplicada (Figura 3.II.8).

Los nanocompuestos fracturados exhibieron diferencias desde el punto de vista estructural las cuales podrían atribuirse a la adhesión relleno-matriz y dispersión de las nanopartículas en la fase continua de quitosano que difiere en cada sistema dependiendo la proporción y características de las nanopartículas ensambladas en el nanocompuesto (Figura 3.II.8).

3.II.4.2 Difracción de rayos X (DRX)

Es conocido que el quitosano es un polímero semicristalino debido a las fuertes uniones puente de hidrógeno intramoleculares (He y col., 2009). Como puede verse en la Figura 3.II.9, la película de quitosano exhibió picos a $2\theta = 8,2; 11,2; 18,1$ y $23,0^\circ$ los cuales son característicos de este polímero (Abdel-Rahman y col., 2015). Los estudios obtenidos mediante DRX reflejaron la pérdida del empaquetamiento estructural de las cadenas de quitosano con la inclusión de AG, modificándose el patrón de difracción del polímero.

La reflexión ubicada a $2\theta = 23,0^\circ$ se intensificó debido a la presencia de AG, mientras el pico a $11,2^\circ$ experimentó un corrimiento a $11,6^\circ$ y el de $8,2^\circ$ prácticamente desapareció. La inclusión de AG resultó capaz de interrumpir los enlaces intramoleculares de la fase cristalina, permitiendo que las moléculas de quitosano interactúen con el compuesto activo (Kanimoshi y col., 2016).

Por otro lado, la inclusión de partículas funcionalizadas en bajas proporciones ($Q_{N,A,B}$ 1:0,5) llevó a que las intensidades de las reflexiones de los picos de los nanocompuestos ubicados a $8,7^\circ$ y a $11,7^\circ$ fueran comparables con las del quitosano (Figura 3.II.9 a y b). En ensamblado de mayores proporciones de nanopartículas llevó a la atenuación y desaparición de los picos característicos del quitosano. La falta de nuevos picos o las modificaciones en los existentes demostraría la coexistencia de dos fases, polímero y nanopartículas, de acuerdo con Azizi y col. (2014). Este resultado es concordante con lo observado por SEM.

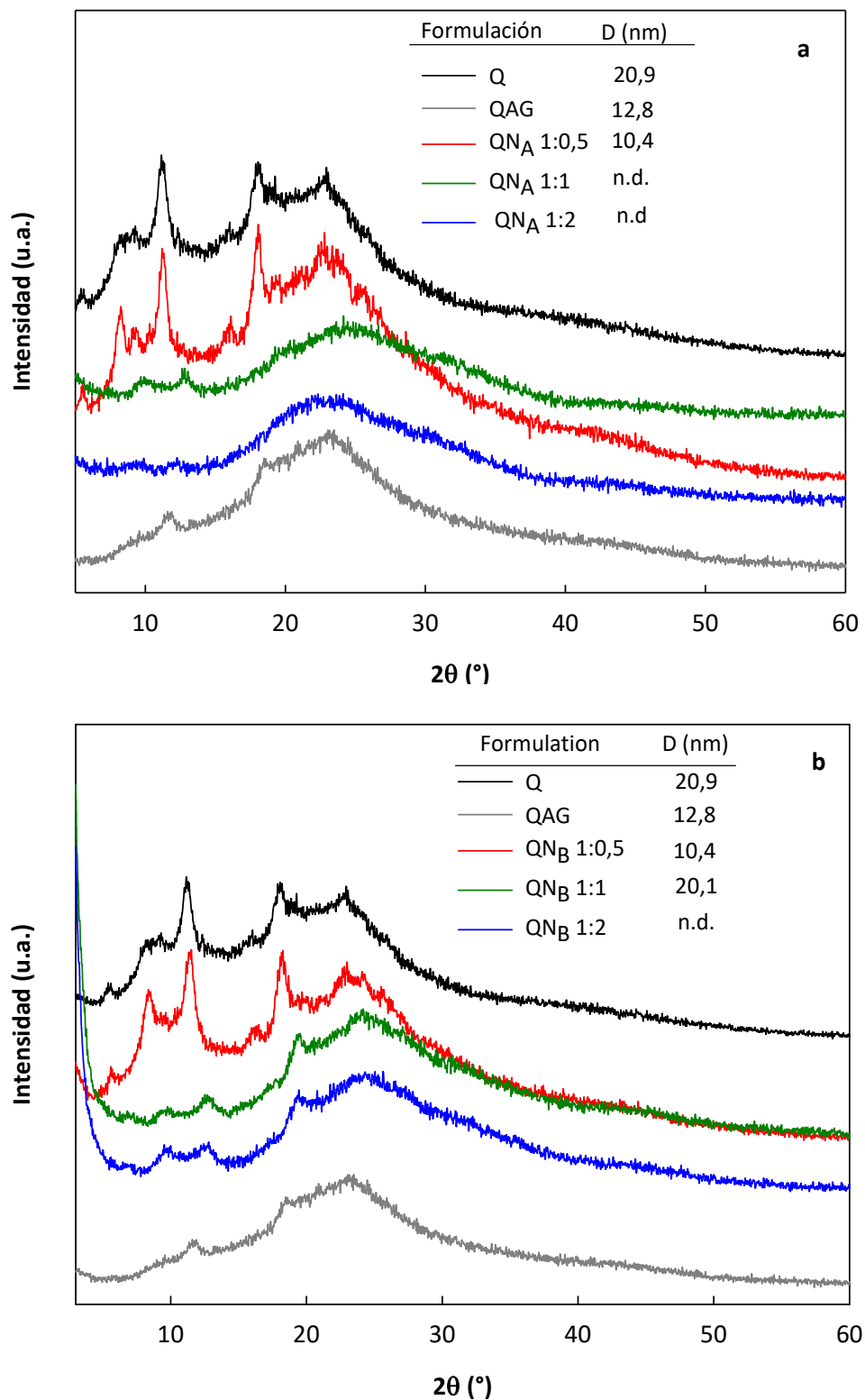


Figura 3.II.9. Espectros de difracción de rayos X de las películas Q, QAG y nanocompuestos:

a) QNA 1:0,5, 1:1 y 1:2 y **b)** QNB 1:0,5, 1:1 y 1:2.

El tamaño cristalino promedio fue calculado utilizando la ecuación de Debye-Scherrer (Kaviyarasu y col., 2013; 2015):

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad [3.II.1]$$

donde,

β es el área a mitad de altura de pico, K es la constante de Scherrer que depende de la geometría (0,90), λ es la longitud de onda de la radiación incidente ($\lambda=0,1540$ nm), D es el tamaño de cristal y θ es el ángulo de difracción de Bragg en grados.

El pico de difracción seleccionado para calcular el tamaño cristalino fue el de la reflexión cercana a $18,1^\circ$ (Muniz y col., 2016). La matriz de quitosano exhibió un tamaño de dominio cristalino de 20,9 nm. La disminución de este parámetro con la inclusión de nanopartículas (N_A y N_B) demostró la existencia de interacciones entre Q, TPP y AG resultando en una estructura más amorfa (Tabla inserta Figura 3.II.9) (Kanimohi y col., 2016). De acuerdo a Sujima-Anbu y col. (2016), las nanopartículas de quitosano presentan una estructura de red entrecruzada formada por cadenas interconectadas entre sí por acción del TPP.

Asimismo, se analizaron los espectros de difracción de rayos X de las películas nanocompuestas conteniendo cápsulas vacías para evaluar la influencia del AG en el arreglo estructural de la matriz (Figura 3.II.10 a y b).

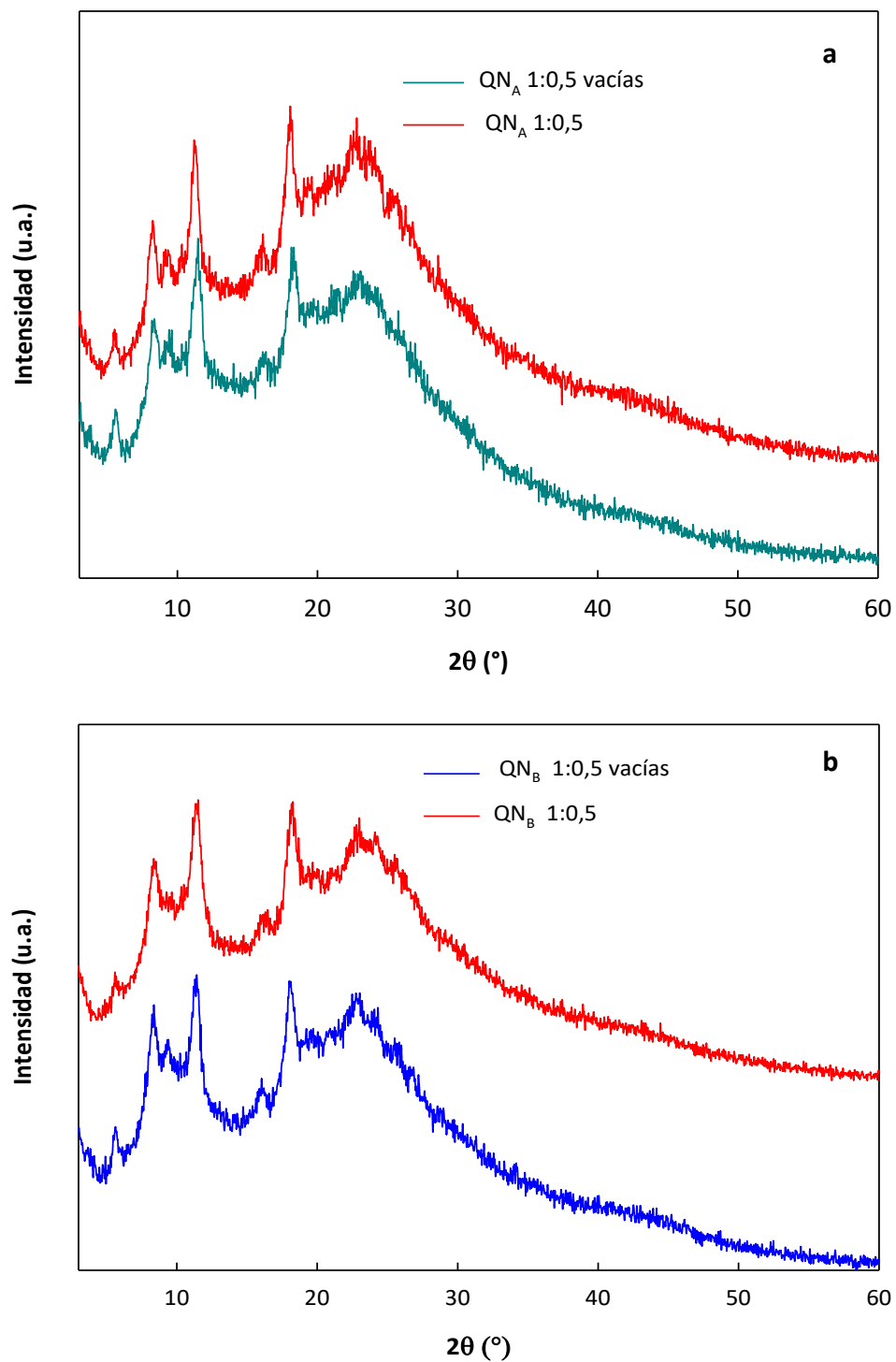


Figura 3.II.10. Espectros de difracción de rayos X de las películas QN 1:0,5 con y sin AG para las formulaciones: **a)** QN_A y **b)** QN_B.

Como se puede ver en la Figura 3.II.10, la ausencia de ácido gálico dio lugar a patrones de difracción con ligeras diferencias con respecto a los de las películas nanocompuestas funcionalizadas con AG. Estos resultados indicarían la existencia de una proporción de AG libre en las películas con nanopartículas cargadas, que produjo modificaciones en la estructura semicristalina del material.

3.II.4.3 Análisis por ATR-FTIR

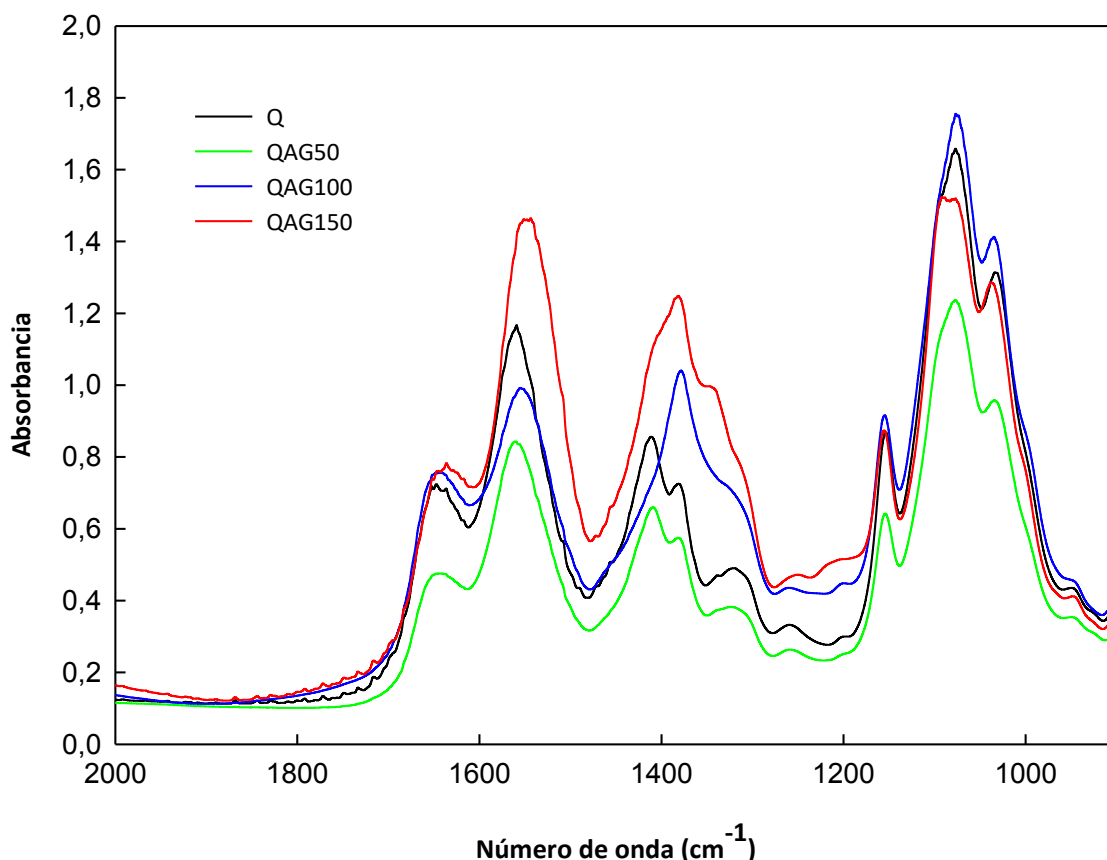
En principio, se analizará el efecto del agregado de ácido gálico a la matriz de quitosano a fin dilucidar las interacciones intervinientes. Como puede verse en la Figura 3.II.11 la inclusión directa de AG en una concentración de 50 mg/g Q no permitió discernir diferencias visibles con respecto a la muestra Q, razón por la cual se analizaron espectros de muestras de quitosano conteniendo concentraciones de 100 y 150 mg_{AG}/g_Q (Figura 3.II.11).

Se pudo observar que a concentraciones de 100 y 150 mg_{AG}/g_Q, las bandas correspondientes a la amida I y amida II se desplazaron a valores menores de número de onda. Este resultado fue similar al informado por Hu y col. (2015), Siripatrawan y Harte (2010).

Wang y col. (2013) encontraron que al aumentar en una matriz de quitosano el contenido de extractos de té (los cuales contienen polifenoles), se produce un corrimiento de la banda correspondiente a la amida II hacia menores número de onda probando la existencia de interacciones entre los grupos amino del quitosano y los carboxilos del AG. Por otro lado, se corroboró la ausencia de interacciones covalentes como las implicadas en un injerto ya que no se observó la aparición de bandas pertenecientes al grupo éster (Sun y col., 2014).

Se observaron modificaciones en la banda ubicada a 1380 cm⁻¹, asociada al estiramiento del grupo C-O de los alcoholes primarios (Lamarra y col., 2016); sumado a esto se pudo ver la desaparición del pico ubicado a 1318 cm⁻¹. Según Wang y col. (2013) la modificación de estas bandas implica cambios estructurales en las cadenas poliméricas de quitosano. También se observaron modificaciones en los modos vibracionales de los grupos -OH del quitosano

(3000-3500 cm^{-1}) las cuales pueden ser atribuidas a un incremento en las interacciones de



tipo puente de hidrógeno Q-AG (Lamarra y col., 2017).

Figura 3.II.11. Espectros de FTIR de la región comprendida entre 2000 y 900 cm^{-1} de la muestra Q y las muestras QAG con distintas concentraciones de compuesto activo.

Bozic y col. (2012) informaron que a valores de pH de 4,5 (cerca de las soluciones de quitosano preparadas en este trabajo de Tesis) hay una interacción de tipo electrostática entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo del AG, que estaría modificando la señal de los grupos amida I y II en los espectros de FTIR.

Por otra parte, del análisis espectral de los nanocompuestos presentados en la Figura 3.II.12 a y b se observa que el pico de absorción de la banda ubicada a 900 cm^{-1} , atribuido al estiramiento P-O-P (Gierszewska-Drużyńska y Ostrowska-Czubenko, 2010) sufrió un incremento en intensidad y un marcado ensanchamiento con el aumento en la proporción de

nanopartículas. Adicionalmente se produjo un corrimiento de la banda adscripta a la amida II (Figura 3.II.12 a y b) como consecuencia de la interacción de los grupos amino del Q y los grupo

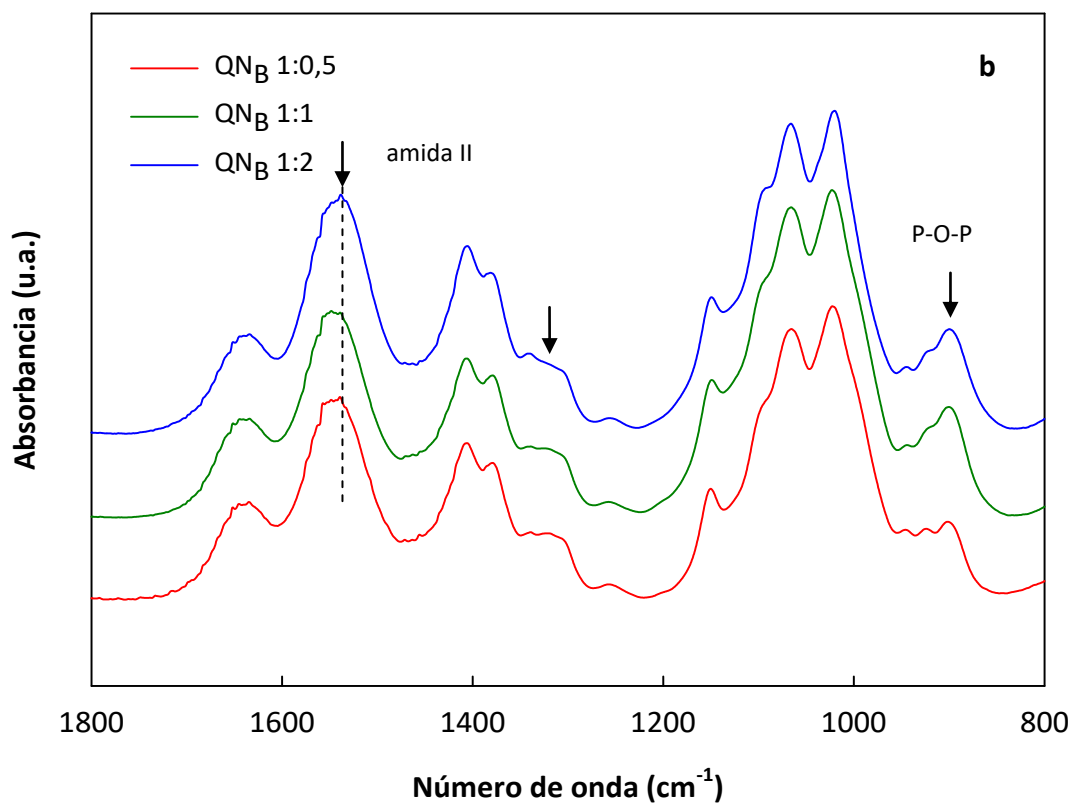
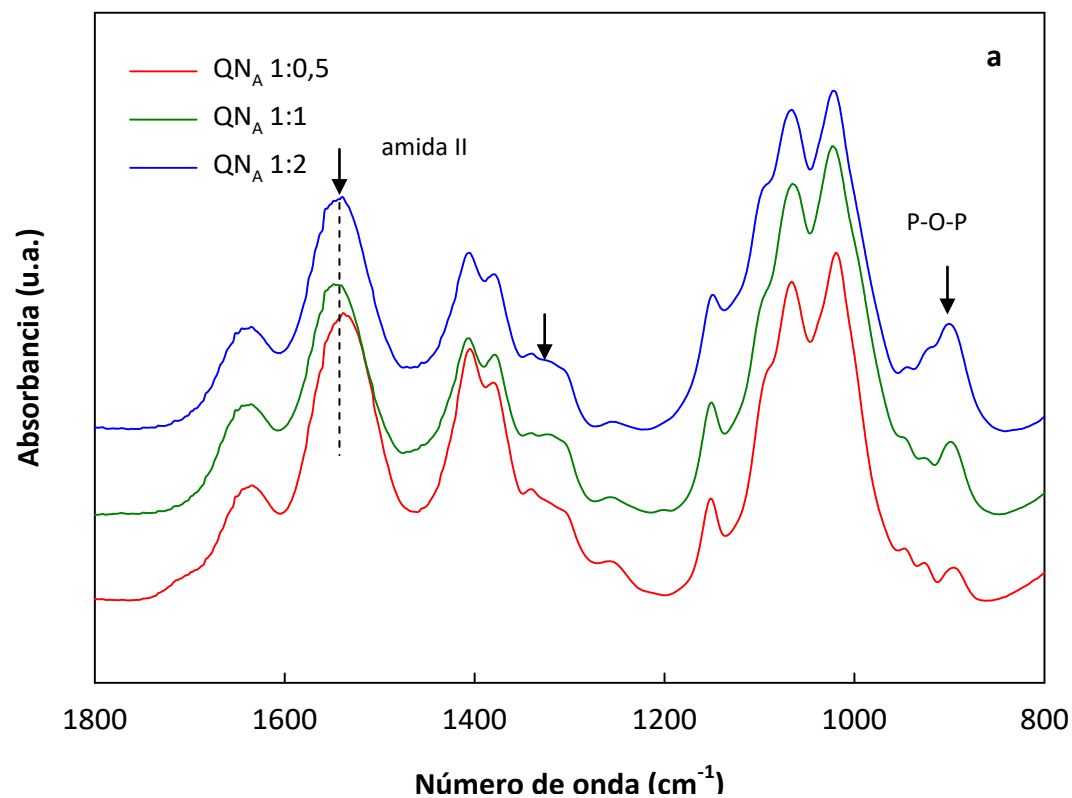
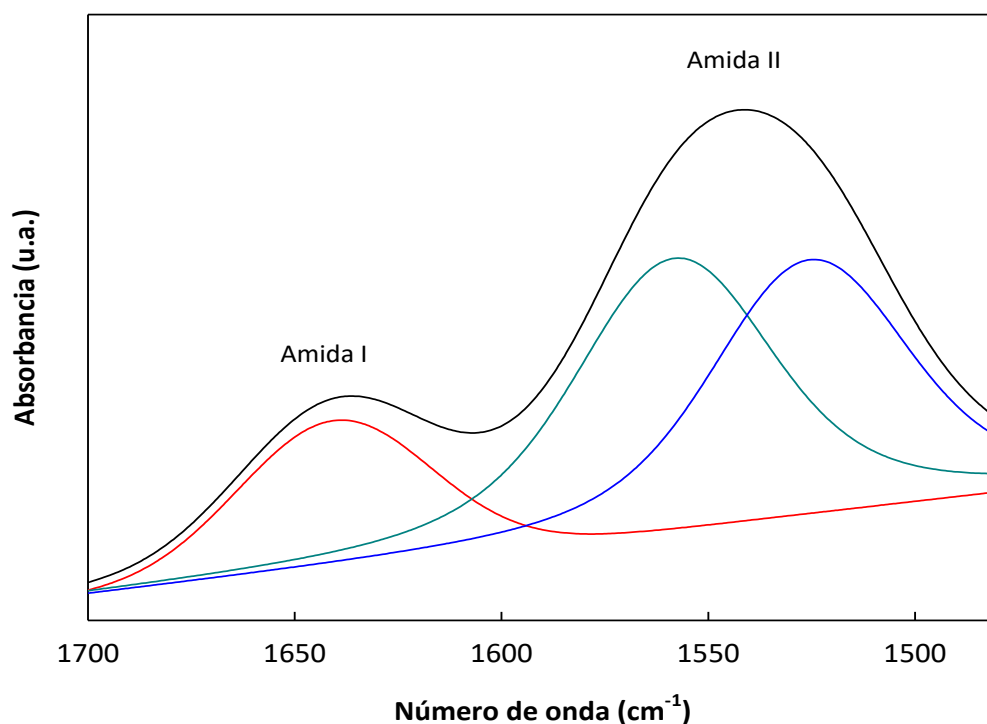


Figura 3.II.12. Espectros de FTIR-ATR de las muestras en la región espectral 1800-800 cm^{-1} : a) QN_A 1:0,5, 1:1, 1:2 y QN_B 1:0,5, 1:1, 1:2.

Como ya se explicó, para mejorar la resolución espectral de los picos pertenecientes a los modos vibracionales de la amida I y II se recurrió a técnicas matemáticas como la deconvolución de los espectros obtenidos (Figura 3.II.13 y 3.II.14 a y b). La deconvolución de la banda ubicada a 1637 cm^{-1} mostró un único pico luego del proceso iterativo de ajuste de curvas, mientras que la descomposición de la banda perteneciente a la amida II evidenció dos picos ubicados a 1555 y a 1524 cm^{-1} con distinta contribución a cada uno de ellos dependiendo el nanocompuesto de estudio. Ramón y col. (2001) atribuyeron estos picos a enlaces tipo puente de hidrógeno intra e intermoleculares.



3.II.13. Deconvolución de los espectros ATR-FTIR en la región comprendida entre 1400 y 1700 cm^{-1} de la muestra de quitosano.

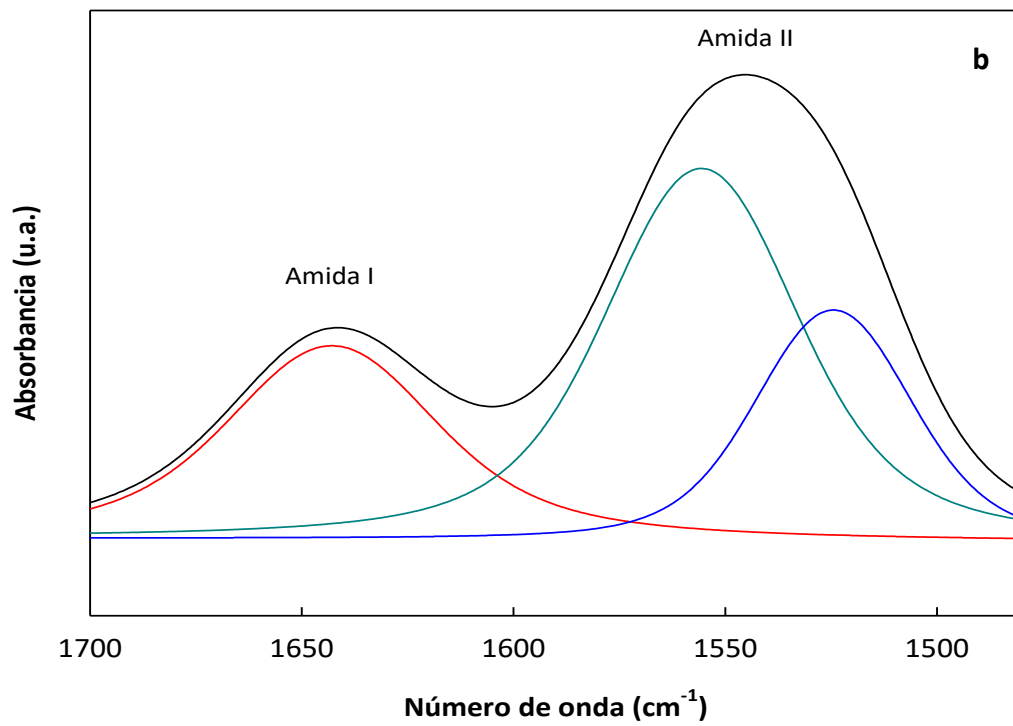
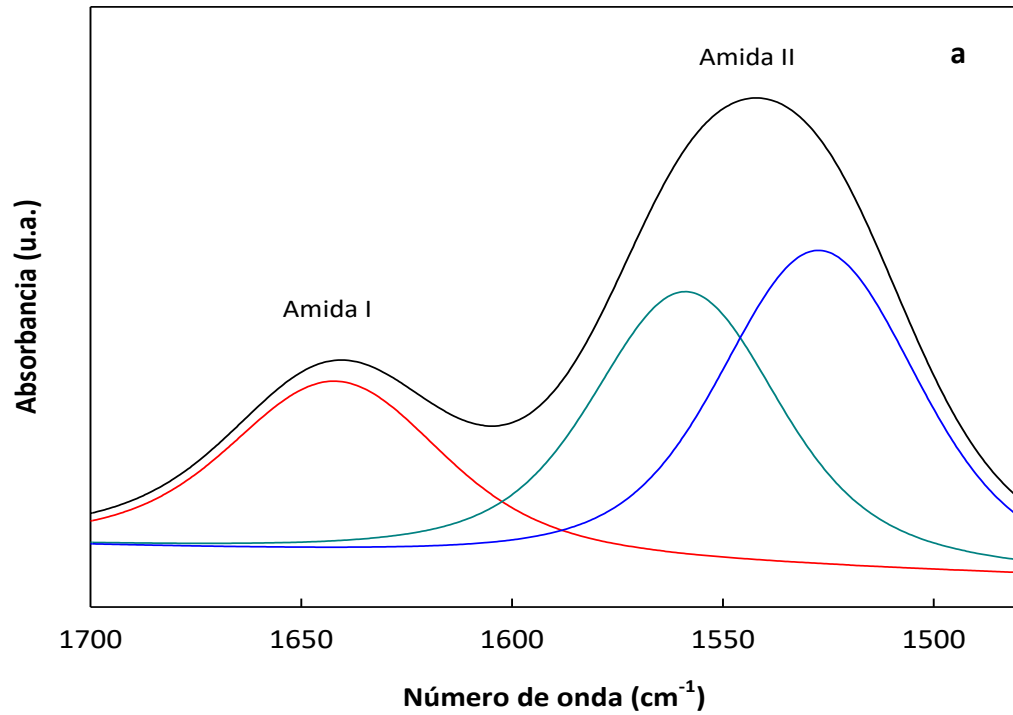


Figura 3.II.14. Deconvolución de los espectros ATR-FTIR en la región comprendida entre 1400 y 1700 cm^{-1} de las muestras: **a)** QN_A 1:0,5 y **b)** QN_B 1:0,5.

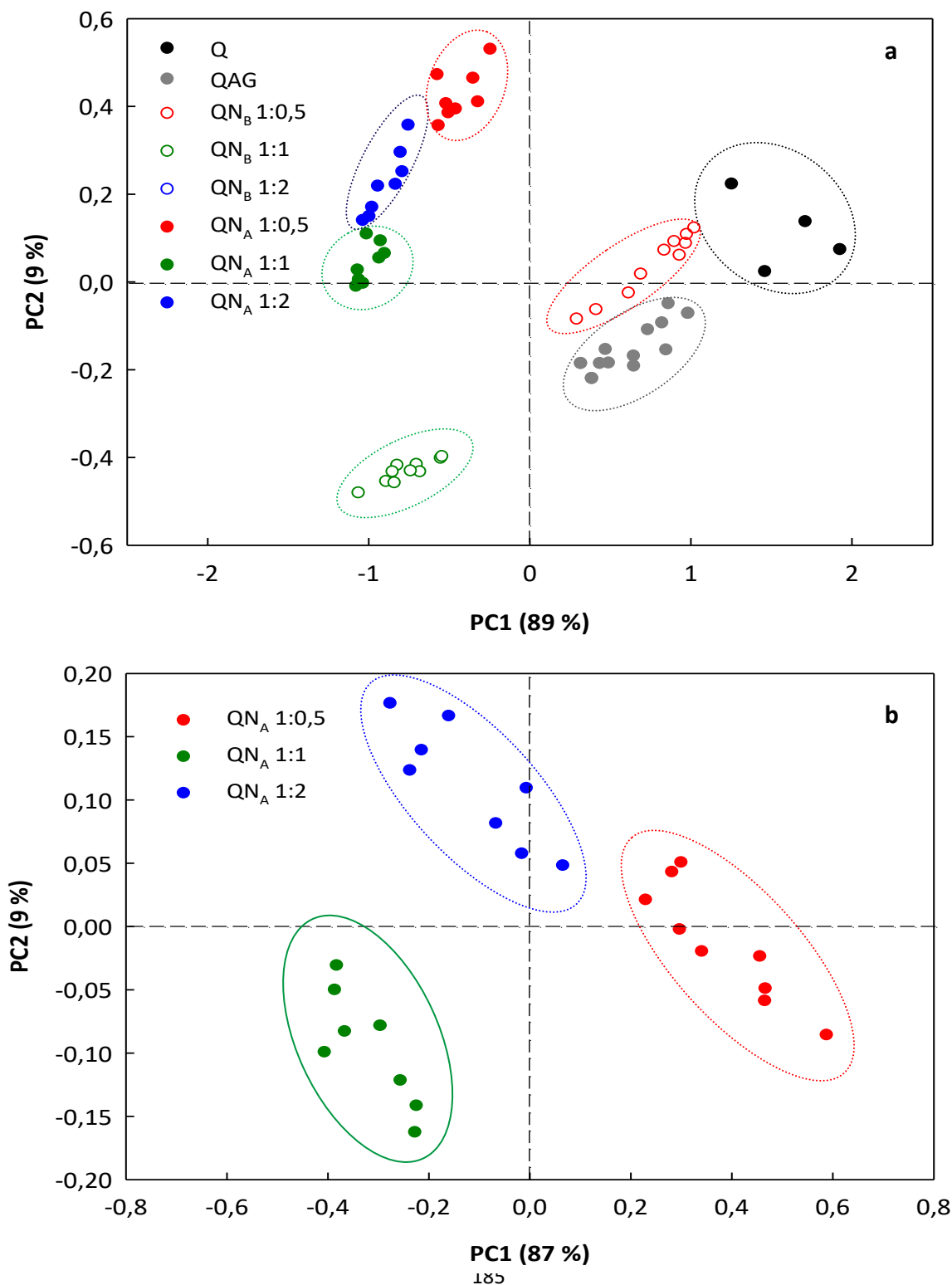
3.II.4.4. Aplicación de técnicas quimiométricas PCA y PLS

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir del procesamiento de las bandas espectrales para dilucidar las interacciones entre los distintos componentes presentes en los nanocompuestos (Romano y col., 2018). El análisis de PCA requiere el cálculo de una matriz de covarianza de un *set* de datos para minimizar la redundancia y maximizar la varianza (Rivero y col., 2017). La variación sistemática de los valores experimentales puede ser explicada por medio de las dos PCs. En la Figura 3.II.15 se puede observar la diferencia entre los distintos grupos de muestras, precisamente entre los *clusters* pertenecientes a Q con respecto a QAG y a las películas nanocompuestas. Al comparar los espectros de absorción ATR-FTIR de las muestras Q, QAG y los nanocompuestos en la región espectral comprendida entre 1400 y 1750 cm^{-1} se observó la separación en dos grupos, confirmando lo discutido en la *sección 3.II.4.3*. Esta separación también se observó en la región espectral comprendida entre 2600 y 3600 cm^{-1} (no mostrada).

Se analizaron las muestras con distintas proporciones de nanopartículas. A partir del gráfico *biplot* se pudo inferir que la incorporación de nanopartículas permitió discriminar entre grupos de muestras considerando la región espectral comprendida entre 1400 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} (Figura 3.II.15). Se observó una separación entre las formulaciones QN_A y QN_B a lo largo del eje de PC1. Sin embargo, todos los nanocompuestos QN_A se localizaron a la izquierda del eje de PC1, mientras las formulaciones QN_B se ubicaron a ambos lados del eje. El alto porcentaje de la varianza explicado por PC1 (89%) indicó la exactitud para discriminar los espectros de ATR-FTIR de las distintas matrices nanocompuestas. En particular, la alta densidad de *cluster* correspondiente a las matrices QN_A indicó una baja variabilidad entre las muestras. Un comportamiento opuesto se observó para las formulaciones QN_B donde la distribución fue más dispersa.

Dada la complejidad para establecer diferencias entre las distintas proporciones de cada formulación en este esquema con inclusión de Q y QAG, se llevó a cabo una separación entre

las formulaciones QN_A y QN_B para profundizar el análisis (Figura 3.II.15 b y c). Se observaron resultados similares cuando se analizó la región espectral comprendida entre 2600-3600 cm⁻¹ (datos no mostrados).



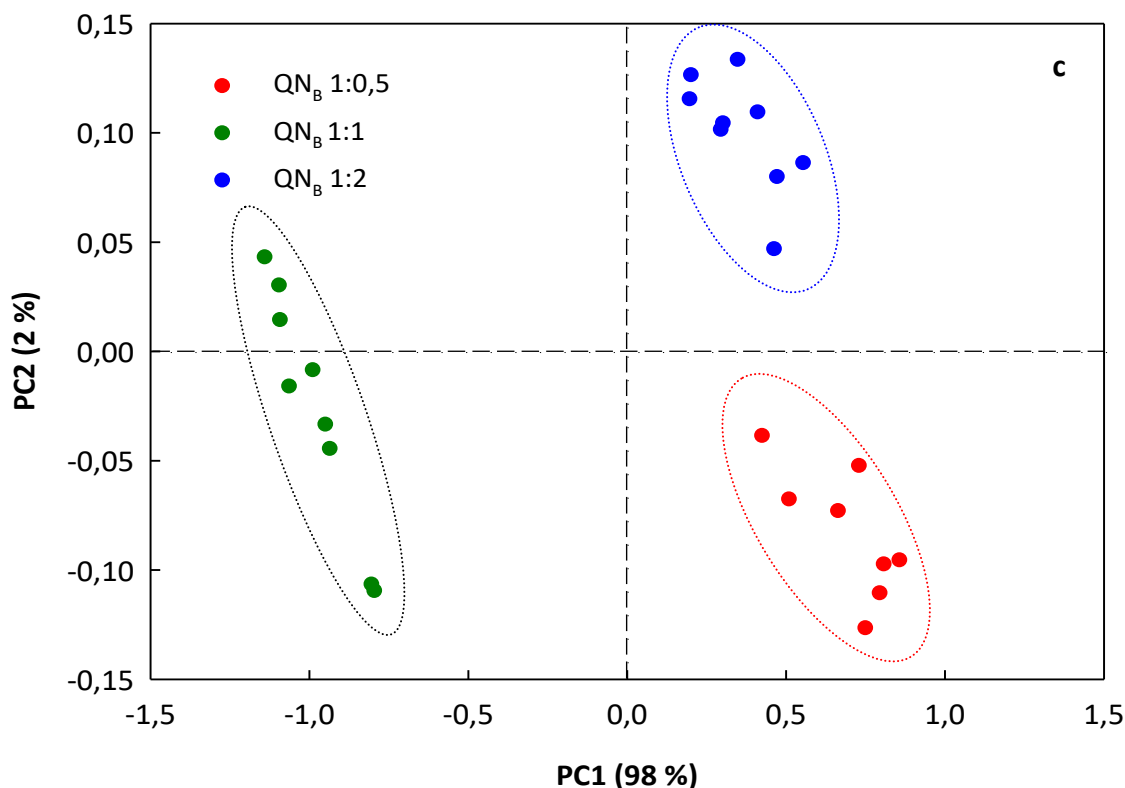


Figura 3.II.15. Análisis de componentes principales de la región espectral comprendida entre 1400 y 1750 cm^{-1} de las muestras: **a)** Q, QAG, QN_A QN_B, **b)** QN_A y **c)** QN_B con distintas proporciones de nanopartículas.

Adicionalmente el análisis llevado a cabo por PLS permitió el ajuste de un set de datos experimentales evaluados a un número de onda seleccionado (900 cm^{-1}) como una función de la concentración del anión TPP (C_{TPP}) a través del modelo utilizado el cual aparece inserto en la Figura 3.II.16. El pico ubicado a 900 cm^{-1} se seleccionó como una banda representativa de las modificaciones experimentadas por la matriz de quitosano como consecuencia de la inclusión de nanopartículas. Se obtuvo un ajuste satisfactorio entre los valores predichos y el modelo con un $R^2 > 0,99$.

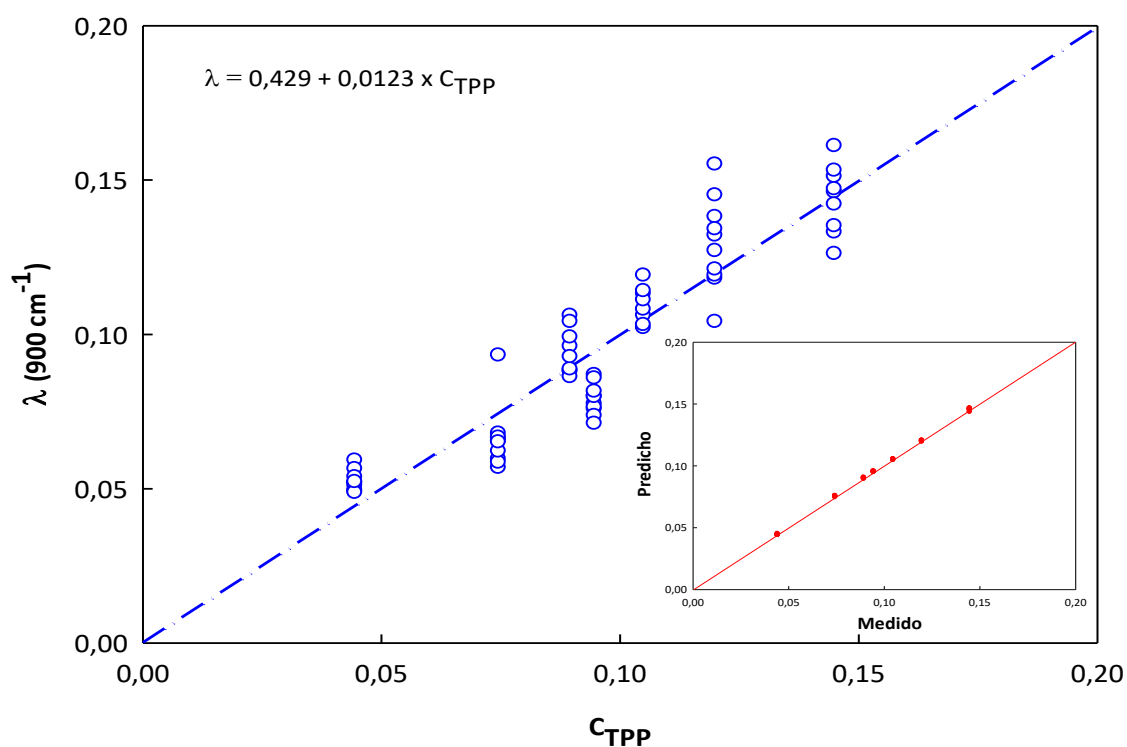


Figura 3.II.16. Correlación entre la absorbancia correspondiente a 900 cm^{-1} y la concentración de tripolifosfato de sodio (C_{TPP}) obtenida mediante el modelo PLS. La Figura inserta muestra los valores predichos vs los medidos.

3.II.4.5. Estudios térmicos por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la Figura 3.II.17 se muestra el termograma obtenido por medio de DSC de la muestra en polvo de AG donde se observan dos transiciones endotérmicas ubicadas a 112,1 y 262,8°C.

La primera transición correspondió a la pérdida de agua y la segunda estuvo relacionada a la fusión de la mezcla de los isómeros del AG. da Rosa y col. (2013) informaron que las temperaturas de fusión de estos compuestos ocurren a 100°, 221° y 250°C.

Las curvas obtenidas para los nanocompuestos muestran un evento endotérmico asociado a la remoción de agua presente en la matriz. Para las formulaciones QN_A 1:0,5, QN_B 1:1, QN_B 1:2, la transición endotérmica se ubicó a 125°C lo que indicaría la formación de un complejo

de inclusión. Resultados similares fueron informados por diversos autores (Alves y col., 2016; da Rosa y col., 2013).

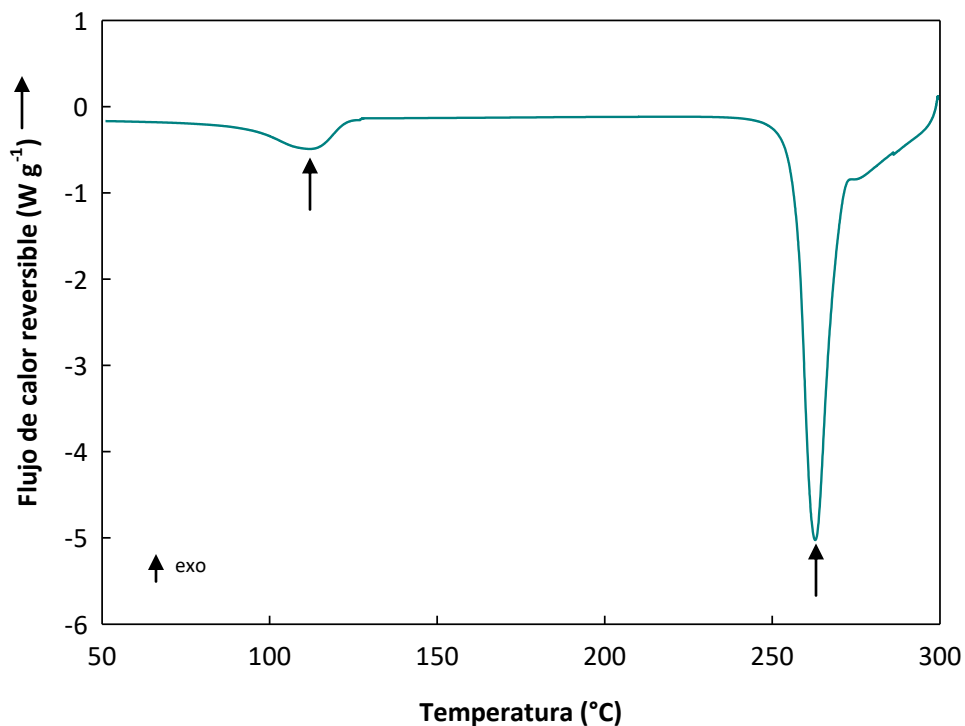


Figura 3.II.17. Termograma obtenido por medio de DSC de la muestra en polvo de AG.

Asimismo, se observó un corrimiento de la transición hacia mayores temperaturas en los sistemas formulados con una alta proporción de nanopartículas (Figuras 3.II.18 a y b). La alta relación Q:TPP (Figura 3.II.18 a) y por lo tanto la menor capacidad de entrecruzamiento, causó un corrimiento del pico hacia mayores temperaturas para las formulaciones 1:1 y 1:2. En el caso de la relación Q:TPP= 3, el desplazamiento se produjo para la película 1:2 (Figura 3.II.18 b). Este resultado podría atribuirse a la presencia de ácido gálico libre en la matriz con una temperatura de fusión a 250°C (da Rosa y col., 2013; Nagpal y col., 2012).

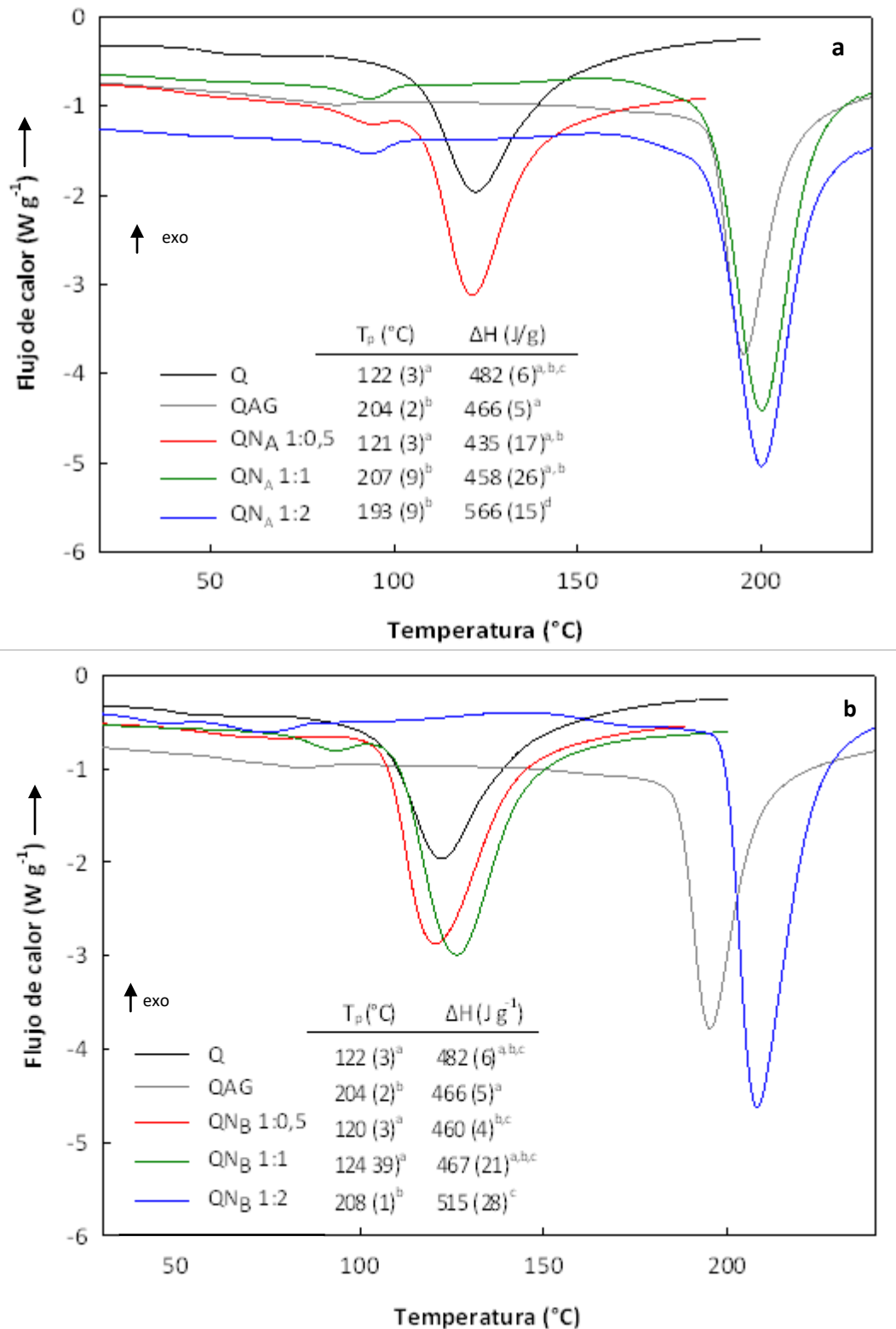


Figura 3.II.18. Termogramas obtenidos mediante MDSC de películas de Q, QAG y nanocompuestos QN: **a)** QN_A y **b)** QN_B.

Al incrementarse la proporción de nanopartículas, la cantidad de AG libre fue más alta, resultando en un corrimiento de la transición endotérmica hacia mayores temperaturas, siendo este efecto más pronunciado en las formulaciones con nanopartículas N_A . Este fenómeno podría ser atribuido al hecho de que las nanopartículas N_B contenían una alta concentración de TPP que promovió la interacción iónica entre las cargas negativas del agente entrecruzante y los grupos del quitosano cargados positivamente.

Por lo tanto, la variación en la entalpía evidenciada a través de las curvas de DSC y la posición del pico relacionada a la pérdida de agua indicarían cambios moleculares y físicos causados por la interacción de las moléculas de AG con el polímero.

De acuerdo a Shavi y col. (2011), la ausencia de un pico de fusión ubicado a temperaturas diferentes a las del compuesto activo puro en el termograma indica que la droga se dispersa uniformemente a nivel molecular en las partículas. En las matrices nanocompuestas coexistirían dos fases, una fase enriquecida en nanopartículas cargadas con AG y otra fase compuesta de quitosano y AG libre.

La Figura 3.II.19 muestra las temperaturas de transición vítrea (T_g) obtenidas de la curva de flujo de calor reversible. La presencia de nanopartículas en la matriz de quitosano produjo un corrimiento de las T_g detectadas para el quitosano hacia menores temperaturas. Este fenómeno se correlaciona con los valores de humedad informados en la Tabla 3.I.1.

Sharma y col. (2016) informaron que la temperatura de transición vítrea de las matrices nanocompuestas puede ser usada para estudiar el efecto de las nanopartículas sobre el comportamiento térmico. Las modificaciones de los parámetros térmicos en función de la carga son también usadas para inferir cambios en el empaquetamiento molecular de las cadenas poliméricas como resultado de interacciones polímero-relleno (Sharma y col., 2016).

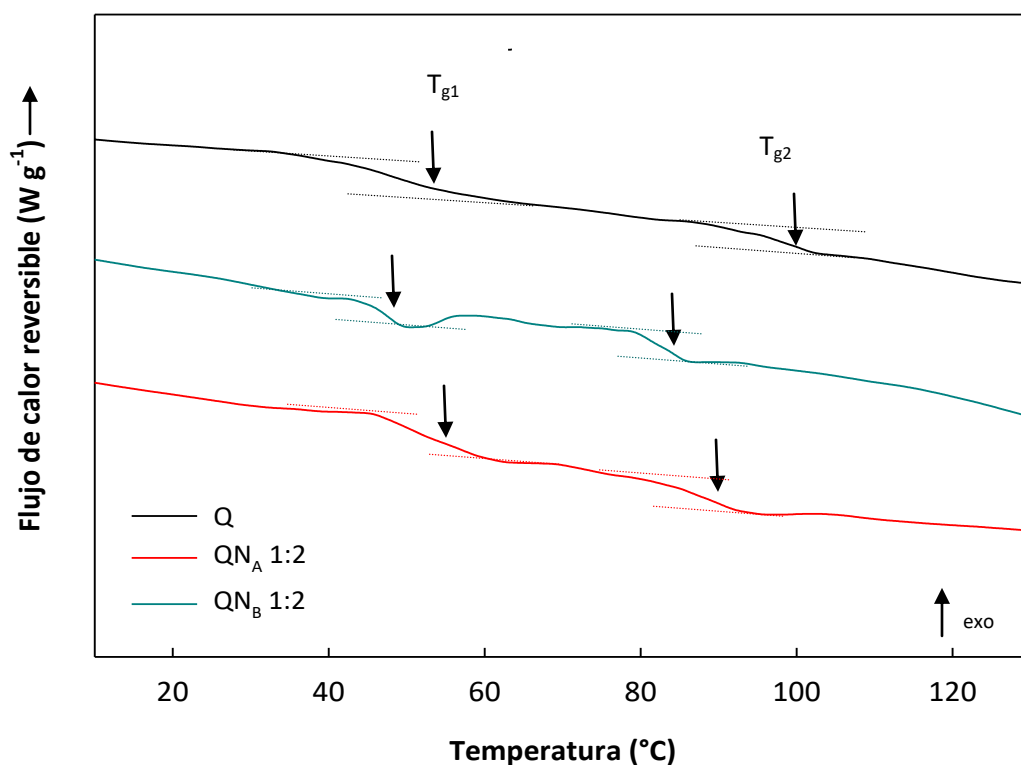


Figura 3.II.19. Curvas de flujo de calor reversible obtenidas por MDSC mostrando las temperaturas de transición vítrea de películas Q (línea negra), QN_A 1:2 (línea roja) y QN_B 1:2 (línea verde). Las flechas indican los puntos de inflexión correspondientes a las T_g s.

3.II.4.5 Análisis por PALS

Para materiales semicristalinos o amorfos, los positrones pueden aniquilarse en diferentes áreas de vacancia como son los sitios de volumen libre o defectos cristalinos (Hsieh y col. 2001). El espectro de un material polimérico puede ser ajustado mediante 3 tiempos de vida media, correspondiente a la aniquilación del p-Ps (τ_1 , I_1), del positrón libre (τ_2 , I_2), y del o-Ps (τ_3 , I_3). Se puede encontrar una correlación entre el radio del volumen libre y el tiempo de vida del o-Ps a través de la ecuación 3.II.xx

$$\frac{1}{\tau_3} = 2 \left[1 - \frac{R}{(R + \Delta R)} + \frac{1}{2\pi} \text{Sen} \left(\frac{\pi R}{R + \Delta R} \right) \right] \quad [3.II.2]$$

En donde R es el radio promedio de la cavidad del volumen libre. Con la ecuación 3.II.2 se puede calcular el volumen de la cavidad considerando un volumen esférico (Minfeng y col., 2008; Liu y col., 2014; Xia y col., 2017)

$$Vl = \frac{4\pi R^3}{3} \quad [3.II.3]$$

Debido a la sensibilidad a vacancias o defectos, la técnica de PALS ha sido utilizada para caracterizar y estudiar materiales nanocompuestos a nivel molecular.

Como puede verse en la Figura 3.II.20a, cuanto mayor fue la relación Q:N, las temperaturas de transición vítrea (T_g) se desplazaron hacia menores valores de temperatura. Es importante notar que la organización molecular corresponde a un estado amorfo gomoso teniendo así una T_g cercana a la temperatura ambiente. La inclusión de nanopartículas causó un incremento en el tiempo de vida τ_3 y por lo tanto el volumen libre presentó un máximo cuando la relación Q:N tomó el valor 1:1.

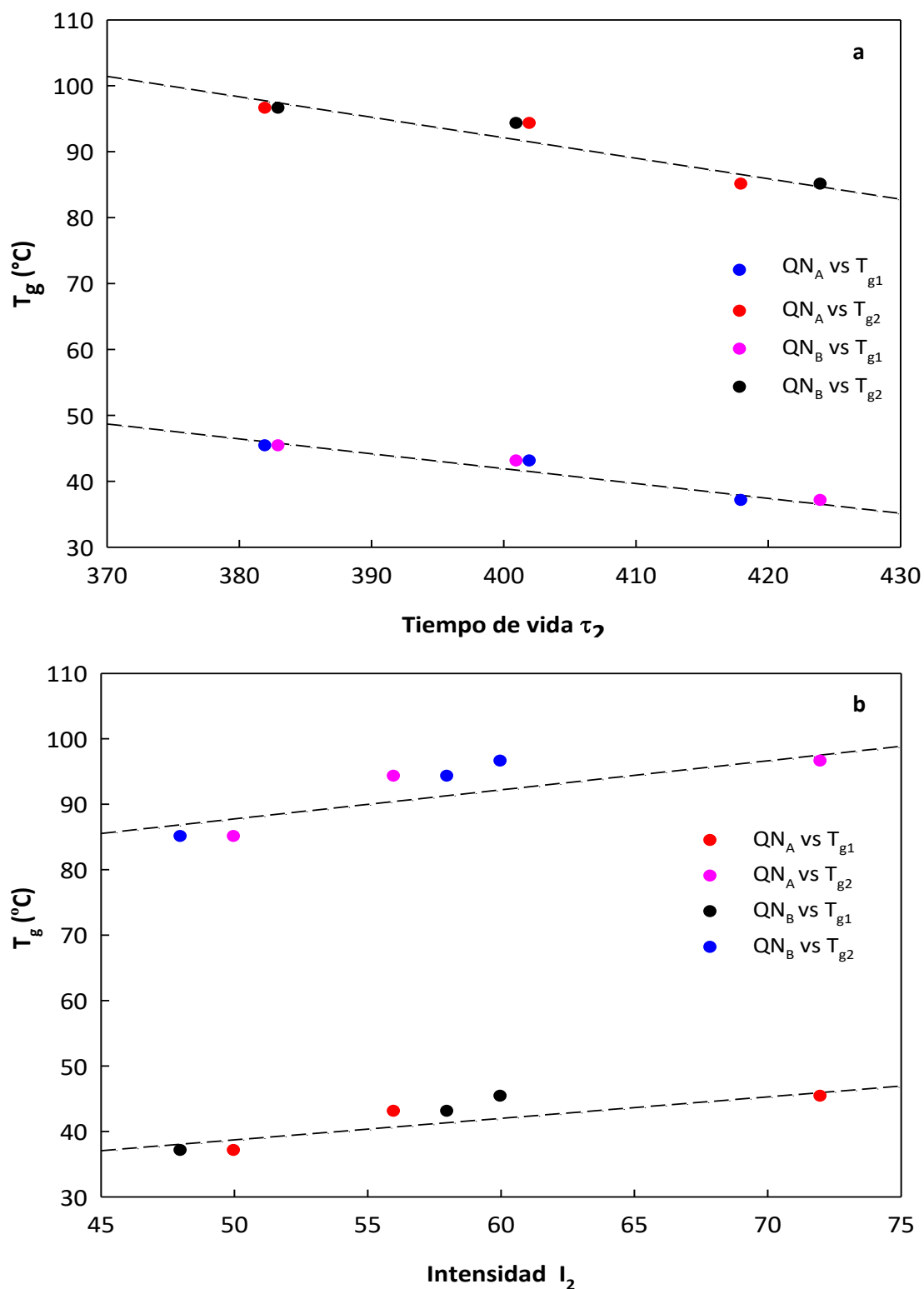


Figura 3.II.20. Correlación entre las temperaturas de transición vítrea (T_{g1} y T_{g2}) y **a)** el tiempo de vida del Ps (τ_2) y **b)** su correspondiente intensidad (I_2) para diferentes relaciones Q_{N_A} y Q_{N_B} .

Para la misma fracción, hubo un paralelismo entre los valores de T_g de las formulaciones conteniendo N_A o N_B con el volumen libre calculado mediante la ecuación 3.II.3. Adicionalmente, las variables de las matrices QN_A se mantuvieron por encima de las obtenidas para las películas QN_B .

No fue posible inferir la existencia de una relación lineal entre ambas temperaturas de transición vítrea y el volumen libre independientemente de la relación Q:TPP (Figura 3.II.21).

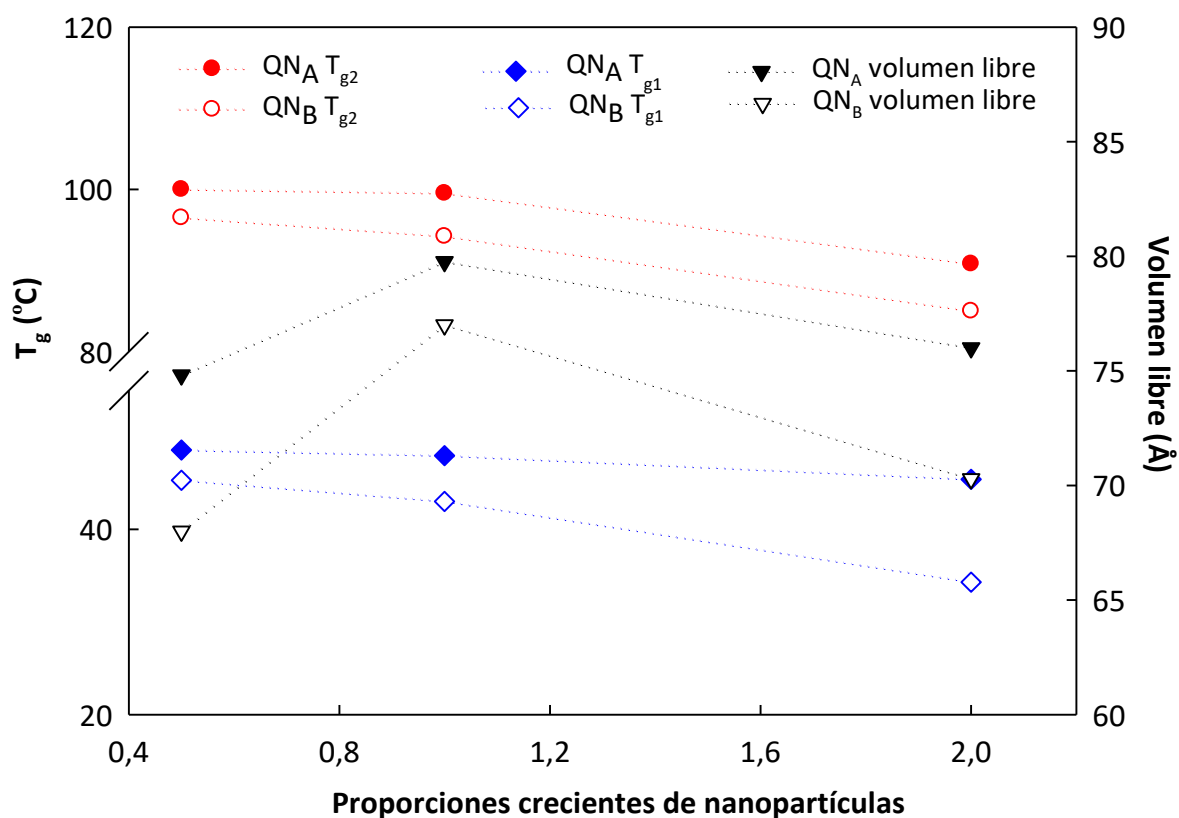


Figura 3.II.21. Temperatura de transición vítrea y volumen libre en función del contenido de nanopartículas.

Este fenómeno puede ser atribuido al hecho de que el análisis puede estar basado no sólo en la variable o-Ps sino también en los parámetros del positrón libre. Consecuentemente considerando sólo τ_2 , I_2 , los cuales estuvieron asociados a la aniquilación del positrón en la

interfase, se estableció una relación lineal creciente entre T_g e I_2 y una relación inversa entre T_g y τ_2 (Figuras 3.II.20 a y b).

De acuerdo a Sharma y col. (2016) esta pérdida de linealidad con el tiempo de vida media del o-Ps puede ser explicada considerando la existencia de una pobre dispersión (agregación) con el incremento de la concentración de nanopartículas. Las nanopartículas tienden a formar agregados, lo cuales pueden ser generados por la existencia de una gran relación superficie/volumen e interacciones intermoleculares, como son las electrostáticas, hidrofóbicas y de van der Waals (Mardila y col., 2016).

El aumento en la intensidad I_2 puede ser explicado teniendo como base la existencia de un incremento en la concentración de interfases con la incorporación de una mayor proporción de nanopartículas (Fan y col., 2018).

El proceso de captura de positrones en defectos presentes en las interfases provee variaciones en ambos tiempos de vida media τ_2 y τ_3 (Biswas y col., 2006).

La interacción entre el polímero Q y las nanopartículas pudo restringir la movilidad molecular de las cadenas, dando una reducción en el tamaño del volumen libre en la vecindad de las nanopartículas. Como resultado el tiempo de vida de o-Ps aumentó al variar la relación Q:N. Resultados similares fueron observados por Fan y col. (2018) quienes encontraron un aumento en el volumen libre de matrices de PVA al agregar fracciones bajas (0,15% en volumen) de nanorellenos de óxido de grafeno. Este fenómeno fue atribuido a una interrupción del empaquetamiento del polímero debido a la presencia de las nanopartículas, generando un consecuente aumento en el volumen libre en tanto que el agregado de una mayor cantidad de nanopartículas generó una disminución en el volumen libre. Según Fan y col. (2018) los nanorellenos no forman parte de la estructura cristalina de la matriz produciendo restricciones en la movilidad de las cadenas poliméricas en la fase amorfa. Estos autores, además aclaran que a mayores concentraciones empiezan a ponerse de manifiesto fuerzas intermoleculares de tipo puente de hidrógeno lo cual genera una restricción en el espacio libre entre las cadenas poliméricas.

3.II.4.6. Modelado matemático del proceso de liberación

Para estudiar procesos difusivos el modelo aceptado es el descrito por la primera ley de Fick, la cual establece que la velocidad de transferencia de una sustancia que difunde a través de la unidad de área de una sección es proporcional al gradiente de concentración medido en forma normal en dicha sección:

$$F = D \frac{\partial C}{\partial x} \quad [3.II.4]$$

En donde F es la velocidad de transferencia del agente activo por unidad de área de la sección perpendicular al flujo, C es la concentración del agente activo que difunde, x es la dirección normal espacial y D el coeficiente de difusión, el cual en muchos casos puede ser considerado como constante.

Sin embargo, la primera ley de Fick es solo válida para medios isotrópicos en los que la estructura y las propiedades de difusión son las mismas en cualquier punto del sistema relativo a una posición de referencia. En un medio no isotrópico la medición del coeficiente de difusión da distintos resultados según la región donde es evaluado, por lo cual el coeficiente de difusión D no se puede considerar constante.

Si se considera que una de las etapas del proceso de liberación controlada del componente activo está ligada con la transferencia de materia, se puede aplicar la segunda ley de Fick

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_m \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad [3.II.5]$$

donde,

C es la concentración de compuesto activo expresada como peso de soluto por volumen de solución; D_m es el coeficiente de difusión efectivo (m^2s^{-1}) y t es el tiempo (s).

Si consideramos una placa plana de espesor δ (Figura 3.II.22):

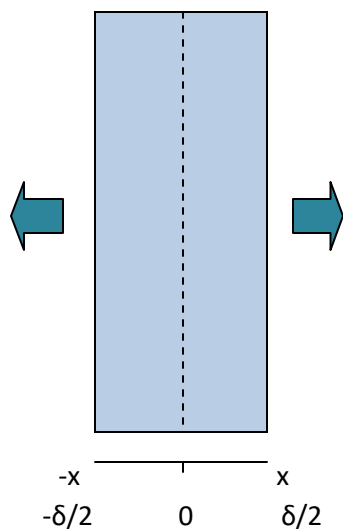


Figura 3.II.22. Placa plana donde se realiza el proceso de difusión.

Las condiciones de contorno para esta placa de espesor δ son:

$$t=0 \quad -\delta/2 < x < \delta/2 \quad C=C_0$$

$$t>0 \quad x=\pm\delta/2 \quad C=C_1$$

donde, t es el tiempo en segundos, δ el espesor de la película, C_0 es la concentración inicial de la sustancia que difunde y C_1 es la concentración de la sustancia en el medio de liberación a un tiempo $t>0$.

Para un estado no estacionario, la solución analítica de la ecuación 2 tiene la forma de una serie trigonométrica:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} e^{\left[\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D_m t}{\delta^2} \right]} \quad [3.II.6]$$

Siendo M_t la cantidad de sustancia liberada a tiempo t , M_∞ corresponde a la cantidad liberada a tiempo infinito. Esta es una aproximación válida hasta la liberación del 60 % de la cantidad inicial.

A tiempos cortos se puede considerar la solución para un medio semi-infinito

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left\{ \frac{D_t}{\delta^2} \right\}^{1/2} \left[\frac{1}{\pi^{1/2}} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{ierfc} \frac{n\delta}{2\sqrt{D_t}} \right] \quad [3.II.7]$$

Donde ierfc es la función error integrada en x.

Simplificando la expresión para tiempos cortos se llega a la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{\frac{D_m t}{\pi \delta^2}} \quad [3.II.8]$$

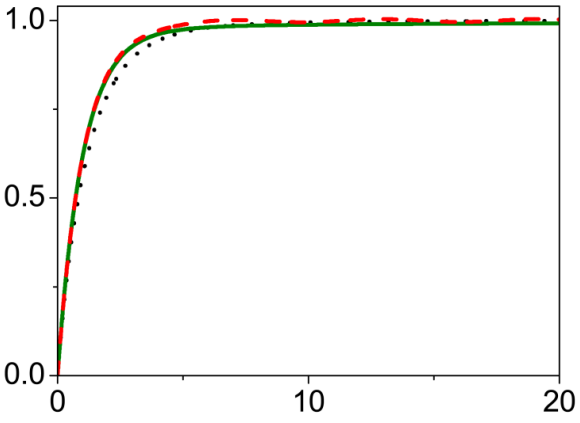
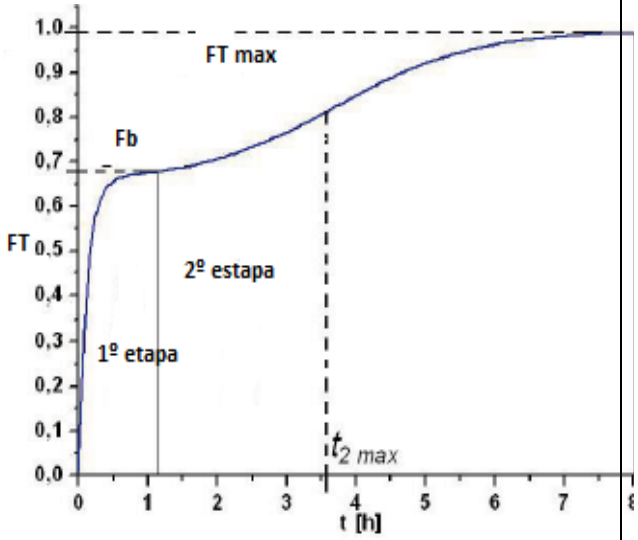
Para sistemas que se hinchan en contacto con el medio en el que difunde el componente activo, la solución se puede escribir teniendo en cuenta el aporte del proceso difusivo que se rige por la ley de Fick y el hinchamiento sufrido por la matriz:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \sqrt{t} + k_2 t \quad [3.II.9]$$

Para la etapa de difusión del compuesto activo que sigue la ley de Fick, la ecuación indica que la masa correspondiente al 60% del total del componente capaz de difundir se puede expresar como una constante multiplicada por la raíz cuadrada del tiempo (caso I). Para la segunda etapa, caso II, la fracción másica varía con el tiempo.

Existen distintos modelos que describen la difusión de componentes activos que pueden estar libres o encapsulados en una matriz polimérica:

Tabla 3.II.1. Modelos semiempíricos utilizados para modelar la liberación de AG en medio acuoso. Adaptado de Balcerzak y col. (2010)

Modelo	Ecuación	Descripción
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$ 	<p>k: constante que depende de la forma y la estructura del material dosificador</p> <p>n: exponente que indica el tipo de mecanismo de transporte que controla la liberación</p>
Gallagher-Corrigan	$F_t = F_b (1 - \exp(-K_b t)) + (Y - F_b) \frac{\exp(kt - kt_{\max})}{1 + \exp(kt - kt_{\max})}$ 	<p>FT (M_t/M_∞): fracción total de compuesto activo liberado a tiempo t</p> <p>K_b: constante de velocidad del burst</p> <p>F_b: fracción de compuesto activo liberado en la fase burst</p> <p>Y: fracción de compuesto activo liberado al terminar el proceso</p> <p>t_{\max}: tiempo para llegar a la velocidad máxima</p> <p>k: constante de velocidad de la fase de degradación del</p>

El primero de los modelos semiempíricos descriptos en la Tabla 3.II.1 es el de Kosmeyer-Peppas (Korsmeyer y Peppas 1981) el cual es válido siempre y cuando la cantidad de compuesto liberado no exceda el 60%. En esta ecuación se combinan dos procesos uno debido al transporte del compuesto activo que obedece las leyes de Fick y el otro a la expansión dinámica del sistema, que involucra la transición del estado vítreo al gomoso (transporte tipo II). El valor del coeficiente n describe el tipo de transporte controlante en el proceso de liberación (Peppas 1985); si $n=0,5$ se dice que la liberación del compuesto activo queda regida por un transporte de tipo Fickiano, en tanto que si $0,5 < n < 1$ se produce una relajación de las cadenas poliméricas sumado al proceso de difusión, con lo cual se habla de un transporte anómalo. Valores de $n > 1$ suelen presentarse cuando los tiempos de liberación son muy elevados y este tipo de transporte se denomina transporte supercaso II. Por último, valores de $n < 0,5$ se asocian a la presencia de poros en la matriz polimérica con la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada y de los poros hidratados con el medio de disolución.

En el modelo de Gallagher-Corrigan se describen dos tipos de procesos por los cuales se da la liberación, en el primero de ellos denominado *Burst*, el componente activo presente en la superficie (interfase sólido-líquido) es removido y liberado al medio; esta fase depende de la solubilidad del compuesto activo en el medio de liberación y de la cantidad presente en la superficie. La ecuación que describe este proceso inicial es la siguiente:

$$M_t = M_\infty F_b (1 - \exp(-K_b t)) \quad [3.II.10]$$

donde, M_t es la cantidad de compuesto activo en la solución a tiempo t , F_b es la fracción de compuesto activo liberado en la fase *burst*, W_∞ es la cantidad de sustancia activa capaz de liberarse y K_b es una constante que depende del coeficiente de difusión y de la solubilidad del compuesto a liberar.

La segunda fase de la liberación está descrita por la degradación del polímero donde se encuentra el compuesto, en general esto se da cuando una sustancia activa está encapsulada en una matriz polimérica. Este comportamiento puede ser descrito por una ecuación de la forma:

$$\ln\left(\frac{x}{1-x}\right) = k t + k t_{\max} \quad [3.II.11]$$

Donde x es la fracción de compuesto liberado al tiempo t , k y t_{\max} son la constante de velocidad y el tiempo en el momento de la remoción máxima de compuesto activo respectivamente. Combinando ambas ecuaciones se llega al modelo de Gallagher-Corrigan:

$$F_T = F_b (1 - \exp(-K_B t)) + (Y - F_b) \frac{\exp(kt - kt_{\max})}{1 + \exp(kt - kt_{\max})} \quad [3.II.12]$$

El mejor modelo que predijo la liberación controlada de AG proveniente de la película QAG es el de Gallagher-Corrigan (Tabla 3.II.2). Dado que el exponente de difusión obtenido fue de $n=0,6$, la liberación del compuesto activo se regirá por dos mecanismos en paralelo, uno Fickiano y otro controlado por el hinchamiento de la matriz ($717 \pm 2\%$) (Rivero y col., 2013). El valor de k obtenido fue mayor que el de K_B , indicando que el principal mecanismo que controla el proceso de liberación es el hinchamiento de la matriz.

De acuerdo con Piron y col. (1997), el cambio de un comportamiento Fickiano a uno no Fickiano es gradual, considerando situaciones intermedias, consistente con una matriz que se hincha rápidamente mucho más que el tamaño original.

La evaluación del mecanismo de liberación de AG desde los nanocompuestos da un valor de n en el rango 0,33-0,41, infiriéndose que el mecanismo de liberación durante la primera etapa fue de tipo Fickiano (Tabla 3.II.2). Dado que $K_B > k$ el proceso de liberación se realizó por difusión en la etapa del *burst*, con una segunda fase de hinchamiento más lenta, operando ambos en forma cooperativa. La relación entre K_B y k aumentó con la proporción de nanopartículas presentes en la matriz. Aunque el hinchamiento entre ambas muestras no

difirió significativamente ($p > 0,05$), QN_A 1:0,5 puede tener una liberación más rápida debido al menor contenido de TPP y el mayor tamaño de partícula de la formulación. Mientras tanto los nanocompuestos con mayor proporción de nanopartículas pueden retener una mayor cantidad de AG debido a fuertes interacciones. De acuerdo con Sugita y col. (2013) el proceso de liberación de AG puede deberse a una etapa de hinchamiento del reservorio y a la difusión. Las nanopartículas absorben solvente, lo cual causa la expansión del hidrogel (hinchamiento) aumentando su tamaño y permitiendo la liberación controlada del compuesto activo al medio (Sugita y col., 2013).

En La Figura 3.II.22 se muestran los perfiles de liberación de ácido gálico desde matrices a base de quitosano QAG, y desde los nanocompuestos QN_A y QN_B con sus distintas proporciones. Los datos experimentales se ajustaron mediante el modelo de Gallagher-Corrigan (Ec. 3.II.10) dando como resultado ajustes con R^2 superiores al 0,95 en todos los casos.

Como es sabido el elemento central del mecanismo de liberación del agente activo es la capa de gel formada, capaz de prevenir la desintegración de la matriz y la rápida penetración del agua. En consecuencia, la liberación del compuesto activo es controlada por la difusión a través de la capa de gel y/o por la erosión de la capa (Barzoki y col., 2018).

La cantidad liberada del compuesto activo de todas las formulaciones de nanopartículas poliméricas fue baja, en el rango de 10% a 22% en la primera hora del período de aproximadamente 50 h (Figura 3.II. 23). Después de 10 h, el porcentaje de droga liberada se situó entre el 17 y el 35% para los nanocompuesto $QN_{A,B}$ 1:2 o $QN_{A,B}$ 1:1, respectivamente, alcanzando un valor del 55% para matrices funcionalizadas con AG por inclusión directa. A partir de ese momento, la disminución del porcentaje de liberación del compuesto activo se debió a la formación de una pared de polímero biodegradable más compacta alrededor del mismo que controla la liberación sostenida durante un período más prolongado. Un aumento en la concentración del polímero causa un aumento en la viscosidad del gel con la consiguiente formación de una capa de gel con una mayor trayectoria de difusión. Esto

podría provocar una disminución del coeficiente efectivo de difusión del compuesto activo y, por lo tanto, una reducción de la tasa de liberación.

En ambos nanocompuestos con menor proporción de nanopartículas, el tiempo requerido para llegar a la segunda etapa del proceso de liberación ($t_{\max}=23$ y 33 horas respectivamente) así como el necesario para llegar al máximo de liberación fueron mayores que el de la película QAG ($t_{\max}=13$ horas). De estos resultados se puede inferir que se logró una liberación más controlada y continua con los sistemas nanocompuestos, siendo este efecto más retardado en el caso de la película QN_B 1:0,5. Dado que es uno de los objetivos buscados, este hallazgo representa un avance desde el punto de vista tecnológico. Robert y col. (2012), informaron la presencia de dos etapas en el perfil de liberación, obteniendo un tiempo de dosificación entre 60 y 480 minutos de AG encapsulado en estructuras compuestas de almidón e inulina.

En las películas nanocompuestas con mayor proporción de nanopartículas se observó una disminución de las fracciones del compuesto activo capaz de ser liberado, tanto en la primera como en la segunda etapa (Tabla 3.II.2). Asimismo, el t_{\max} prácticamente llegó a una meseta con valores comprendidos entre 12 y 15 h, K_B experimentó un aumento significativo y k una disminución que el incremento en la proporción de nanopartículas. A partir de los resultados obtenidos se dedujo que un aumento en la cantidad de nanopartículas condujo a la obtención de matrices más rígidas, con mayores interacciones entre los componentes que sólo permitieron la liberación del 30 % del ácido gálico incluido en la matriz. En el caso de la formulación QN_B 1:2, la presencia de una gran proporción de nanopartículas de pequeño tamaño llevaron a la formación de una matriz excesivamente rígida, de difícil manejo, razón por la cual no se usó para los ensayos de liberación.

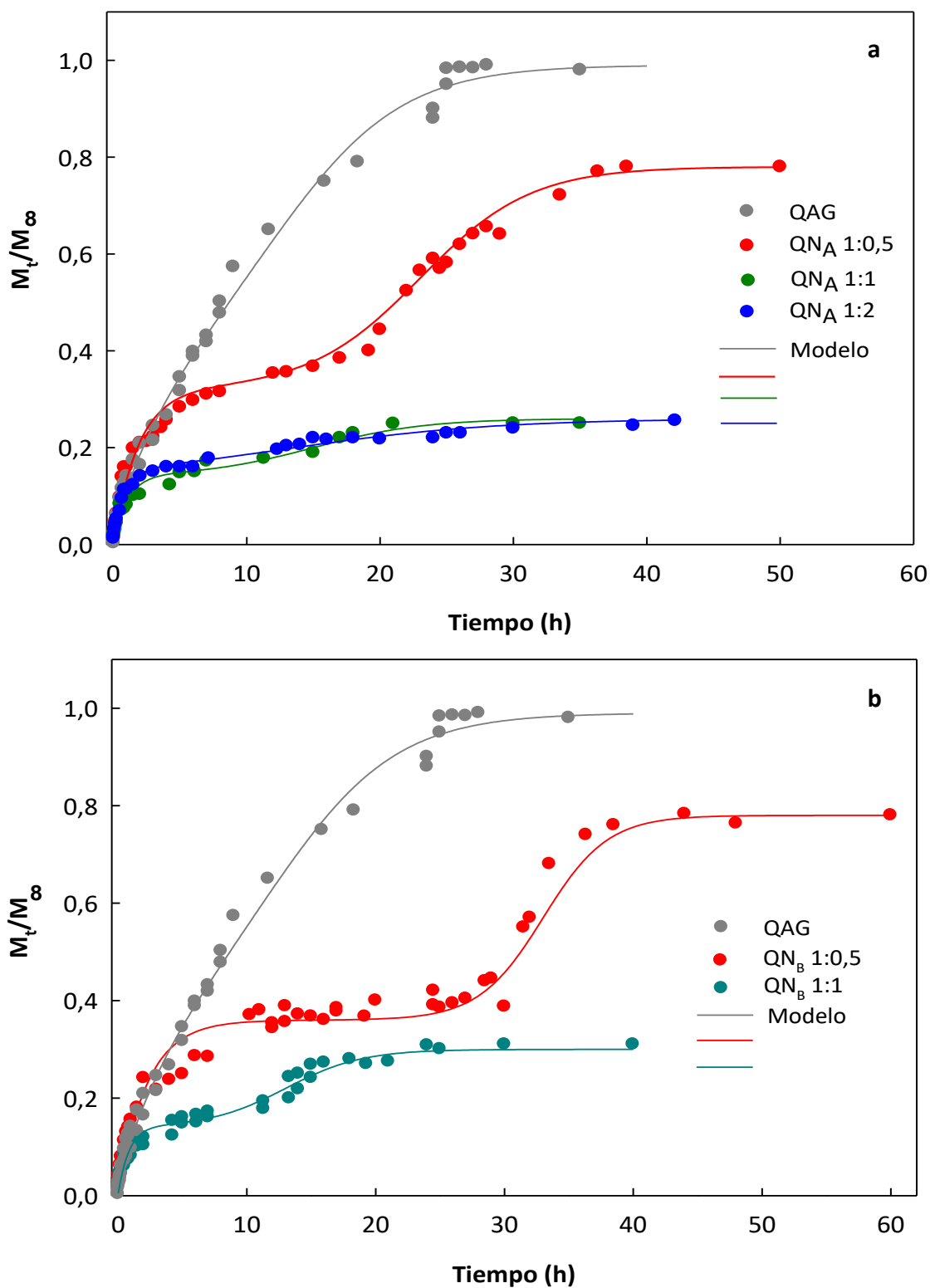


Figura 3.II.22. Perfiles de liberación de ácido gálico desde matrices a base de quitosano (QAG, QN_A y QN_B). Los datos experimentales se ajustaron mediante el modelo de Gallagher-Corrigan (Ec. 3.II.10).

Tabla 3.II.2. Ajustes y de los coeficientes de difusión obtenidos para las distintas películas.

Formulación	Modelo de Gallagher-Corrigan					Modelo de Fick		Coeficiente de difusión $10^{15}(\text{m}^2 \text{s}^{-1})$
	F_B	K_B	k	t_{\max}	R^2	n	R^2	
QAG	0,40	0,206	0,215	13	0,995	0,685	0,986	4,90
QN_A 1:0,5	0,32	0,529	0,241	23	0,999	0,409	0,968	1,67
QN_A 1:1	0,14	0,927	0,240	15	0,974	0,349	0,999	0,38
QN_A 1:2	0,13	1,076	0,131	12	0,990	0,326	0,947	0,33
QN_B 1:0,5	0,36	0,450	0,399	33	0,963	0,342	0,978	1,55
QN_B 1:1	0,14	1,188	0,337	13	0,975	0,337	0,950	0,45

Usando el programa Matchcad 7 Professional (Math Soft Engineering & Education, Inc., Cambridge, USA) se estimaron los coeficientes de difusión a partir de las ecuaciones 3.II.4 y 3.II.6. Dependiendo de la estrategia para incluir al AG, el coeficiente de difusión varió desde $4,9 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ hasta $0,33 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$. En el caso de los nanocompuestos, el proceso fue más lento probablemente debido a la movilidad reducida de las moléculas de compuesto activo en la red de quitosano.

3.II.5. Conclusiones

La adición de nanopartículas convirtió a las matrices de quitosano en materiales más hidrofóbicos debido al rol que juegan el TPP y el ácido gálico en el proceso de entrecruzamiento. El AG también se desempeñó como agente estabilizador de la suspensión y agente activo para llevar a cabo la liberación de forma más controlada comparando estos sistemas nanocompuestos con aquellos con inclusión directa de ácido gálico en la matriz de quitosano. Los mecanismos de liberación del compuesto activo fueron estudiados, comprobándose un comportamiento no-fickiano debido al hinchamiento de las matrices.

Los nanocompuestos formulados con las mayores proporciones de nanopartículas y la mayor concentración de TPP lograron modificaciones significativas en las matrices de Q, en virtud de la reticulación del biopolímero con AG y TPP, especialmente para los nanocompuestos QN 1:1. Los resultados obtenidos mediante MDSC, ATR-FTIR, PALS y SEM mostraron interacciones entre el Q y el AG, debido a la encapsulación del compuesto activo. La técnica de PALS fue adecuada para detectar variaciones en el tamaño y concentración del volumen libre como consecuencia de las diferentes relaciones Q:N y Q:TPP.

En conclusión, el análisis desde un punto de vista estructural reveló cambios significativos en los nanocompuestos que modificaron el comportamiento del material base.

PARTE III

3.III.1. Introducción

3.III.1.1 Ensamblado de materiales

Hasta el momento el uso de películas biodegradables para el envasado de alimentos ha sido muy limitado debido a las pobres propiedades mecánicas y alta sensibilidad a la humedad que exhiben los polímeros naturales (Sumit, 2012).

Estos requisitos para el embalaje se han vuelto cada vez más difíciles de lograr con materiales simples. Para lograr estos requerimientos se han combinado las propiedades de diferentes materiales.

Una alternativa para mejorar las propiedades de los materiales es mediante la obtención de sistemas bicapa o multicapa, que resultan de la combinación de dos o más capas de materiales simples (Rivero y col., 2009). Pereda y col. (2011) combinaron una matriz de quitosano con una de gelatina para diseñar sistemas bicapa mejorando la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua sin alterar las propiedades ópticas de las mismas. Bonilla y col. (2014) desarrollaron películas compuestas a base de quitosano y alcohol polivinílico (PVA) observando cambios a nivel estructural en las matrices desarrolladas. Este polímero también llamado alcohol de polivinilo, polivinil alcohol, o polietenol, es un alcohol polihidroxilado con grupos hidroxilo que se extienden en átomos de carbono alternados. Es un polímero semicristalino, hidrofílico con excelentes propiedades mecánicas y adhesivas (Chen y col., 2008), debido mayormente a la presencia de los grupos -OH en su estructura que permiten establecer interacciones de tipo puente de hidrógeno inter e intramoleculares (Abdelrazek y col., 2010). Las soluciones acuosas de PVA presentan la característica de generar gran cantidad de núcleos cristalinos, lo cual provee a la matriz de ciertas propiedades tales como un alto grado de hinchamiento, naturaleza elástica y una gran resistencia mecánica.

El PVA se encuentra aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA). Actualmente es utilizado en las industrias del papel, textil, en cosmética, alimentos, entre otras. Las películas de PVA son no inmunogénicas, y no-carcinogénicas para el ser humano razón por la cual presentan una elevada potencialidad para aplicaciones biomédicas (Jiang y col., 2011). A pesar de su naturaleza sintética, este polímero es capaz de biodegradarse (Chiellini y col., 2003). Dado que el PVA tiende a transformarse espontáneamente en la forma enol limitando así su polimerización (Hay y Lyon, 1967), comercialmente se obtiene mediante la hidrólisis del poli (acetato de vinilo). Los grupos acetato del polivinil alcohol son hidrolizados en presencia de metilato anhidro de sodio en solución acuosa de hidróxido de sodio (Chiellini y col., 2003). Se pueden obtener distintos tipos de PVA dependiendo del grado de hidrólisis. La reacción puede hacerse en *batch* o en continuo, siendo este último el proceso elegido para la síntesis del polímero a nivel industrial. La Figura 3.III.1 esquematiza la síntesis del poli (vinil acetato) a través de un mecanismo de radicales libres y la correspondiente formación del alcohol polivinílico (Chiellini y col., 2003).

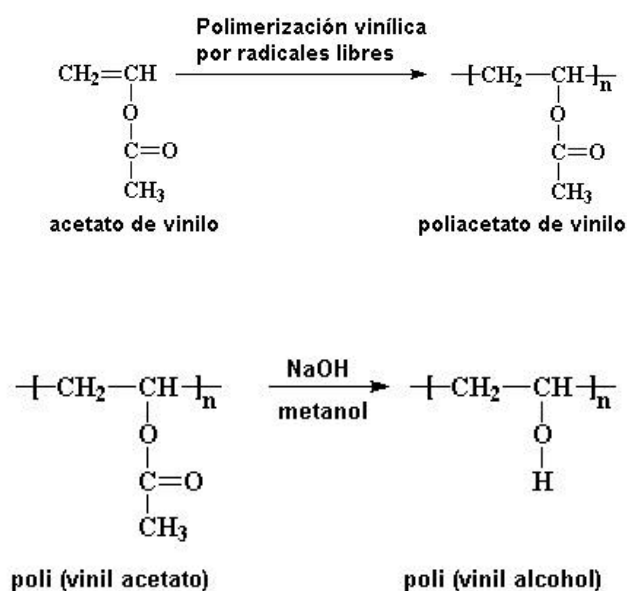


Figura 3.III.1. Representación esquemática del camino de reacción de la síntesis utilizada en la producción industrial del PVA.

Existen diferentes aplicaciones de los sistemas multicapas en el envasado de alimentos. Se pueden diseñar estructuras multicapas con capas intermedias y exteriores con diferentes propiedades mecánicas o de barrera de manera de utilizar estos materiales como barreras pasivas o activas y con óptimas propiedades mecánicas (Rhim, 2007).

Esta tecnología puede llevarse a cabo por impregnación o revestimiento de un soporte con la solución polimérica, o mediante el ensamblado de películas delgadas multicapas obtenidas por deposición secuencial capa por capa (Gu y col., 2013). Asimismo, los sistemas bicapa se pueden obtener por la técnica de moldeo y deshidratación por deposición secuencial de las capas que conforman el sistema (Rivero y col., 2009). En el mismo sentido, es posible obtener las monocapas individuales por el método de moldeo y ensamblarlas por termocompresión preformando un sistema bicapa. Valencia-Sullca y col. (2018) ensamblaron películas de almidón termoplástico y quitosano funcionalizadas con aceites esenciales mediante la técnica de termocompresión.

Los métodos escalables continuos más utilizados a nivel industrial son la extrusión seguida de moldeo por soplado, inyección o termocompresión, que son altamente productivos y energéticamente eficientes (Ochoa-Yepes y col., 2019). La termocompresión es un proceso de moldeo utilizado para materiales poliméricos que consiste en calentar el material o polímero formando una plancha o lámina, de forma que al adquirir una consistencia blanda pueda adaptarse a la forma de un molde, por acción de la presión aplicada, controlando la temperatura a la que se calienta el polímero. Esta temperatura depende principalmente del material con el que se está trabajando. Las ventajas de esta técnica son la utilización de pocas herramientas, bajo costo ingenieril y menor tiempo de procesamiento, lo que hace que el termoformado sea ideal para el desarrollo de prototipos con un bajo volumen de producción.

Los envases formados por múltiples capas es una tecnología ampliamente difundida en el área de los envases sintéticos. Martin y col. (2001) desarrollaron películas multicapa basadas en almidón de trigo y varios poliésteres alifáticos biodegradables preparados mediante las técnicas de coextrusión y moldeo por compresión.

3.III.1.2 Envases bicapa activos

Por otra parte, los cambios en la preferencia de los consumidores por alimentos más seguros, saludables y convenientes han llevado a implementar innovaciones en la tecnología de envasado. En este contexto, surgió el concepto de envase activo (Biji y col., 2015). Esta premisa se contrapone con la principal característica de seguridad que deben cumplir los envases convencionales que mantienen contacto con los alimentos y que deben ser lo más inerte posible (Martins y col., 2018).

Las superficies de un material se pueden funcionalizar con compuestos activos a través de la inmovilización covalente o no covalente. En el primer caso, la superficie del polímero posee una cierta carga neta que puede atraer moléculas con una carga neta opuesta y en el segundo caso se refiere por ejemplo a interacciones específicas ligando-receptor (Arrua y col., 2010; Bastarrachea y col., 2015).

La fusión del concepto de envase activo o funcionalizado con el de sistema multicapa es un área que se encuentra a la vanguardia de nuevos desarrollos para el diseño de materiales aplicables en el campo de alimentos. En este sentido, el ensamblado de una capa de un polímero con otra nanocompuesta funcionalizada con compuestos activos representa una estrategia poco explorada. Sumado a esto, son incipientes las investigaciones que estudien sistemas que ensamblen una capa nanocompuesta de quitosano funcionalizada con nanopartículas activas no metálicas con propiedades antimicrobinas y antioxidantes y una capa de PVA por termocompresión. En sintonía con estas necesidades la aplicación de estos materiales activos en el envasado de alimentos susceptibles a la oxidación representa una alternativa sustentable.

3.III.1.3 Oxidación lipídica

Los lípidos insaturados pueden experimentar procesos de deterioro durante el procesamiento, almacenamiento y/o manipulación de alimentos. Estos procesos pueden dar origen a compuestos tóxicos o indeseables desde el punto de vista de la calidad organoléptica del producto y afectar por lo tanto las propiedades funcionales de sus macrocomponentes, como su valor nutricional (Tironi, 2005). Como es conocido, la

autooxidación de lípidos es una reacción radicalaria (Di Giorgio y col., 2019), como toda reacción de este tipo se divide en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación tal como se muestra en la Figura 3.III.2. La oxidación lipídica es autocatalítica, es decir una vez iniciada, la reacción se autopropaga y autoacelera. Pequeñas cantidades de compuestos prooxidantes y antioxidantes causan cambios significativos en la velocidad de reacción (Guiotto, 2014).

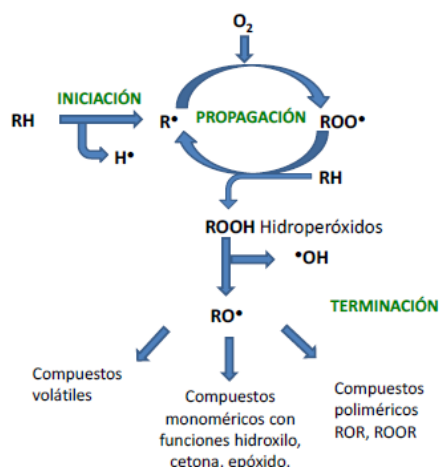


Figura 3.III.2. Etapas involucradas en la oxidación lipídica (Guiotto, 2014).

El uso de recubrimientos protectores y envases adecuados por la industria alimentaria se ha convertido en un tema de gran interés debido a su potencial para aumentar la vida útil de muchos productos alimenticios (Ahvenainen, 2003; Coles y col., 2003; Hernandez y col., 2000). Mediante la selección adecuada de materiales y tecnologías de envasado es posible mantener la calidad del producto durante el tiempo necesario para su comercialización y consumo (Stewart y col., 2002).

Los sistemas bicapas han sido utilizados como materiales para la conservación de alimentos (Muller y col., 2017; Pereda y col., 2011). En esta dirección, Marchetti y col. (2017) estudiaron el estado de conservación de muestras de harina de nuez en envases sintéticos simulando distintas condiciones de humedad y temperatura controlada.

La industrialización de las nueces para producir aceite genera una cantidad significativa de subproductos como la harina de nuez. Este subproducto es un alimento rico en lípidos

susceptibles de sufrir oxidación y con frecuencia se torna rancio perdiendo la calidad durante el almacenamiento debido a su baja actividad acuosa y a su gran superficie expuesta (tamaño de partícula pequeño) (Marchetti y col., 2017). Además, puede experimentar reacciones de descomposición de compuestos nutricionalmente relevantes, como vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, carotenoides, aminoácidos, proteínas entre otros componentes (Guiotto, 2014; Marchetti y col., 2017). Los principales ácidos grasos de la nuez son los insaturados, tales como el ácido oleico y linoleico (Aldunce, 1994; Feldman, 2002).

La oxidación de lípidos conlleva la aparición de olores desagradables (*off-flavors*) y productos de reacción potencialmente tóxicos. La reacción de oxidación se ve afectada por factores como la composición en ácidos grasos, contenido y actividad de pro y antioxidantes, radiación ultravioleta, temperatura, presencia de iones metálicos, presión de oxígeno, superficie de contacto con el oxígeno y actividad de agua (Kolakowska y Sikorsky, 2003). La calidad de la harina de nuez y su estabilidad no solo dependerán de su composición inicial, sino de los métodos utilizados en el procesamiento, envasado y almacenamiento. En este sentido, el envase cumple un rol fundamental, una vez que representa una barrera para algunos de los factores involucrados en el proceso de oxidación y en la pérdida de calidad, cuando se exponen a la luz, oxígeno y vapor de agua.

El desarrollo de diferentes estrategias que permitan retardar la oxidación de los lípidos tales como la incorporación de antioxidantes, la adecuada selección de las condiciones de almacenamiento, así como del envase constituyen las principales premisas que llevaron a proponer los objetivos de esta parte del *Capítulo*.

- Diseñar sistemas bicapa a base de películas nanocompuestas de quitosano y PVA mediante la técnica de termocompresión, estudiando sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera al vapor de agua.
- Evaluar el desenvolvimiento del sistema a partir del análisis térmico y microestructural.

- Aplicar los sistemas obtenidos como material de envase a una harina de nuez y estudiar su estabilidad oxidativa bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

3.III.2 Materiales y métodos

Para la formulación de los sistemas bicapa, se utilizó alcohol polivinílico (PVA) Elvanol T-25 proporcionado por DuPont (USA) con un grado de hidrólisis del 86-89 % y un peso molecular de 50 a 55 kDa. La solución de PVA se preparó con una concentración de 10% p/v por solubilización en agua a una temperatura de 90°C bajo agitación magnética durante 3 horas.

3.III.2.1 Ensamblado de películas para la obtención de sistemas bicapa

Las matrices bicapa fueron preformadas mediante la técnica de termocompresión. En la Figura 3.III.3 se muestra un esquema representativo de las etapas involucradas en el proceso de obtención de los sistemas bicapa.

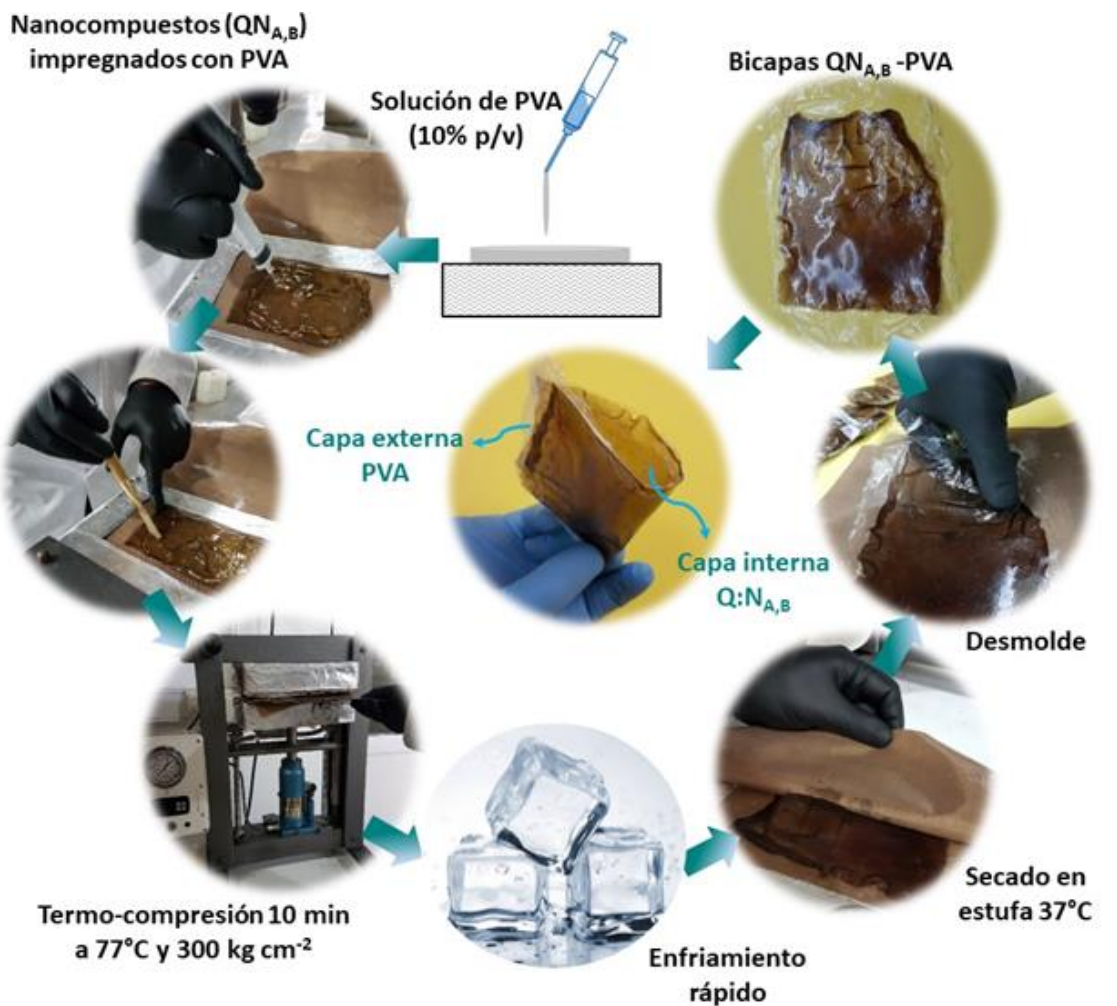


Figura 3.III.3. Esquema de las etapas involucradas en la obtención sistemas bicapa.

Para el diseño de los sistemas bicapa se utilizaron nanocompuestos de quitosano obtenidos por moldeo tal como se describió en la *Sección 3.1.2* y la solución de PVA al 10% (p/v). Considerando que los sistemas bicapa van a ser utilizados como material de envase de alimentos susceptibles de sufrir oxidación, las matrices nanocompuestas se seleccionaron en base a una relación de compromiso entre sus propiedades mecánicas, barrera al vapor de agua y al oxígeno. Así, los nanocompuestos seleccionados para la preparación de los envases bicapa fueron QN_A 1:1 y QN_B 1:1.

Los nanocompuestos se colocaron entre láminas de teflón y se cubrieron con 10 ml de la solución de PVA la cual se esparció sobre la película con ayuda de un pincel, dejando un

borde de PVA alrededor del nanocompuesto. La muestra se sometió a una presión de 300 kg cm⁻² y a una temperatura de 77°C durante 10 min, seguida de un enfriamiento superficial con hielo para facilitar el desprendimiento de las bicapas de la lámina de teflon. Posteriormente las láminas se llevaron a estufa con convección a 37°C para finalizar el secado y posterior remoción del material. La nomenclatura utilizada para los sistemas bicapa formulados fue: QN_A-PVA y QN_B-PVA.

Asimismo, como control se moldearon matrices individuales de PVA por la metodología de termocompresión (PVA_T). Por otro lado, en los casos que fue necesario para dilucidar las interacciones experimentadas en la matriz con consecuencia del tratamiento térmico con presión, las películas nanocompuestas QN_{A,B} se sometieron a un proceso de termocompresión sin la adición de PVA. Estas últimas muestras se denominaron QN_{AT} y QN_{BT}.

3.III.2.2 Caracterización de los sistemas bicapa

Se realizaron determinaciones del contenido de humedad, solubilidad, hinchamiento, permeabilidad al vapor de agua, medidas de ángulo de contacto, ATR-FTIR y color de los sistemas bicapa obtenidos. Las bicapas también fueron sometidas a ensayos de tracción para evaluar sus propiedades mecánicas, en tanto que se analizaron las propiedades térmicas de las mismas a través de MDSC. Asimismo, se realizaron ensayos para determinar la capacidad antimicrobiana de las bicapas frente al desarrollo de *S. aureus* y *E. coli*. Para ello, se utilizaron los procedimientos y metodologías previamente descriptas en la *Sección 3.I.2*.

3.III.2.3 Aplicación de los sistemas bicapa

3.III.2.3.1 Obtención de harina de nuez y cuantificación del contenido de lípidos

Para la etapa de aplicación de los materiales obtenidos se seleccionó como matriz alimenticia la harina de nuez por ser un alimento susceptible de sufrir oxidación lipídica. La harina de nuez se obtuvo a partir del remanente o torta proveniente del proceso de extracción del aceite. El principio de extracción de aceite por prensado se basa en que cada partícula de la semilla o fruto contiene aceite en pequeños orgánulos de forma esférica

(esferosomas) en su estructura celular rodeados por una membrana delgada. La aplicación de una fuerza externa durante el prensado produce la ruptura de las membranas y las paredes celulares, permitiendo la extracción del aceite. La extracción por prensado es el método más sencillo para extraer el aceite de la materia prima previamente tratada. Se utilizó una prensa de tornillo (Figura 3.III.4) que consiste en un cilindro metálico horizontal con un tornillo helicoidal de acero inoxidable de paso de rosca decreciente hacia su extremo, el cual permite aumentar la presión sobre la pulpa a medida que esta avanza por el interior del contenedor. La prensa posee un sistema de calentamiento de cilindro con el fin de mejorar el rendimiento (Clavijo, 2004).

La semilla o fruto pasa a la prensa que en un solo paso separa el aceite del resto de la semilla dejando una torta proteica en forma de *pellets* como subproducto. Los *pellets* se eliminan a través de una abertura ubicada en la parte anterior de la prensa. Este *pellet* retiene alrededor del 10% del aceite originalmente presente en la estructura del fruto y puede destinarse al procesamiento de otros alimentos. La harina de nuez se obtuvo a partir del *pellet* utilizando una procesadora Black+Decker performance Blade (Argentina).



Figura 3.III.4. Prensa de tornillo utilizada para la extracción de aceite de nuez.

Para determinar la aptitud de los envases bicapa funcionalizados para preservar la calidad de harina de nuez frente a la oxidación lipídica, se prepararon muestras realizando mezclas de harina (proveniente del *pellet*) con nuez entera molida en una proporción 75:25, respectivamente.

Los lípidos son solubles en solventes orgánicos por lo que su determinación consiste en una extracción selectiva con solventes. Para cuantificar el contenido de lípidos en la muestra se realizaron extracciones con éter etílico (Anedra, Argentina) en un aparato Soxhlet, según el método normalizado AOAC 920.39. Al menos dos replicados de aproximadamente 5 g de muestra de harina se pesaron en balanza con una precisión de 0,1 mg y se colocaron en las cámaras de extracción del Soxhlet. El procedimiento de extracción es un proceso semicontinuo que permite la acumulación del solvente que entra en contacto con la muestra en la cámara de extracción durante aproximadamente 20-30 min. A lo largo del proceso de extracción el solvente se lleva a ebullición, se condensa a una velocidad de 2 a 3 gotas por minuto entrando en contacto con la muestra y luego se sifona nuevamente dentro del balón de ebullición (Figura I.2). Una vez recuperado y evaporado el solvente se pesa el residuo obtenido (lípidos totales) en el balón previamente pesado y se refiere a la cantidad de muestra pesada en el cartucho de extracción. Los resultados se expresaron en g de lípidos extraídos cada 100 g de harina de nuez.

$$G = \frac{Pb_a - Pb_b}{m} \times 100 \quad [3.III.1]$$

donde,

G es el contenido de grasa (g/ 100 g _{muestra seca}), Pb_a es el peso de balón + grasa (g), Pb_b es el peso de balón (g) y m es el peso de muestra seca (g).

3.III.2.3.2 Envasado

Para envasar la harina de nuez los sistemas bicapa se termosellaron exponiendo la capa de PVA hacia el exterior para permitir la obtención del envase. La capa de nanocompuesto de quitosano funcionalizada con ácido gálico se mantuvo en contacto con el alimento constituyendo la capa interna del material, tal como se muestra en el esquema de la Figura 3.III.3.

Se pesaron aproximadamente 10 g de harina de nuez en cada uno de los envases y se termosellaron (Figura 3.III.5).



Figura 3.III.5. Envase QN_A-PVA conteniendo la harina de nuez a conservar.

Como control primario se utilizaron envases sintéticos PD 960 (CRYOVAC®, Buenos Aires, Argentina) a base de polietileno con una $PO_2 = 3,99 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ a 23°C y una WVP = $14\text{--}17 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) reconocido por su estabilidad frente al termosellado. Con este material también se envasaron muestras de harina de nuez y se almacenaron a temperaturas de 20 y 40°C.

3.III.2.3.3 Cambios de calidad del producto durante el almacenamiento

Se evaluó la oxidación de lípidos del producto en función del tiempo de almacenamiento durante un período de aproximadamente 105 días bajo condiciones controladas de humedad relativa (65% HR) y temperatura. Para el seguimiento de la calidad del producto se prepararon 40 envases conteniendo aproximadamente 10 g de harina de nuez.

Se estudiaron dos niveles de temperatura, ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) y una condición más drástica ($40\pm 1^{\circ}\text{C}$). Los cambios de calidad del producto se detectaron a través de los métodos analíticos: determinación del índice de peróxidos y de compuestos de oxidación secundaria por TBARS.

3.III.2.3.3.1 Índice de peróxidos

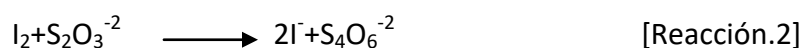
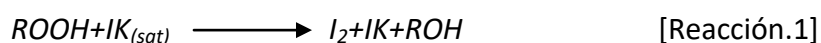
El principal mecanismo de oxidación de los lípidos es la auto-oxidación. Este es un proceso autocatalítico iniciado por formación de radicales en lípidos insaturados seguido de un ataque por parte del oxígeno. Los hidroperóxidos son los productos de la oxidación primaria, y las reacciones posteriores de oxidación, descomposición y polimerización, conducen a la formación de una mezcla compleja de productos de oxidación intermedios y finales que incluyen una amplia variedad de compuestos (Fennema, 2008). Pueden formarse compuestos volátiles y no volátiles, de diferente peso molecular y polaridad y que tengan diferentes funciones oxigenadas, tales como funciones hidroperoxi, hidroxil, aldehído, epoxi y cetónicos. En este sentido, la evaluación de la oxidación lipídica se puede realizar mediante índices analíticos como el índice de peróxido (IP) y del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), indicadores de los productos de oxidación primaria y secundaria, respectivamente (Di Giorgio y col., 2019).

Se determinó la evolución del índice de peróxidos en muestras de harina de nuez envasadas y almacenadas a 20°C y 40°C y a una humedad relativa de 65%, para ello se procedió a realizar una extracción de la materia grasa de las muestras. El almacenamiento bajo condiciones controladas de humedad relativa y temperatura se realizó durante 105 días. A distintos intervalos de tiempo se abrieron los envases control y los sistemas bicapa. Para la extracción de lípidos se pusieron en contacto 5 g de harina de nuez con 20 ml de éter etílico durante 24 horas. En una próxima etapa se procedió a centrifugar la muestra a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante resultante se dejó bajo campana a temperatura ambiente para asegurar la evaporación del solvente y realizar la determinación de peróxidos (IP).

Los lípidos extraídos se pusieron en contacto con una mezcla de ácido acético: cloroformo en una proporción 3:2 y se agitó hasta disolución. Se adicionaron 0,12 ml de solución saturada de IK, se agitó y se dejó en reposo en oscuridad durante 30 min. Posteriormente, se agregaron 30 ml de agua destilada y se tituló, agitando continuamente, con una solución 0,0098N±0,01 de Na₂S₂O₃·5H₂O, hasta desaparición del color amarillo. Se adicionaron 0,5 ml de almidón soluble preparado al 1% (p/v) como indicador y se continuó titulando. El punto final de la titulación se alcanzó con la desaparición del color azul violáceo debido al complejo de inclusión del almidón con el I₂ generado por la reacción del IK con los peróxidos (reacciones redox involucradas 1 y 2). El índice de peróxidos (expresado como miliequivalentes de oxígeno/kg de aceite) se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{N * (V - Vb) * 1000}{m} \quad [3.III.2]$$

Donde N es la normalidad de la solución de Na₂S₂O₃·5H₂O, V el volumen de titulante gastado en la muestra, Vb volumen gastado en la titulación del blanco y m es la masa de materia grasa presente en la muestra.



3.III.2.3.3.2 Determinación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

Por otra parte, en forma complementaria se estudió la calidad de la harina de nuez almacenada a 20°C y 40°C cuantificando la formación de productos de oxidación secundaria. Estos compuestos generalmente son aldehídos y cetonas los cuales pueden detectarse a través del método TBARS (Marchetti y col., 2017). Esta técnica cuantifica las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (Figura 3.III.6). La reacción se basa en la extracción con ácido tricloroacético de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) como el

malonaldehído (MDA) u otros compuestos similares y la posterior formación de un aducto de color rosado entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído.

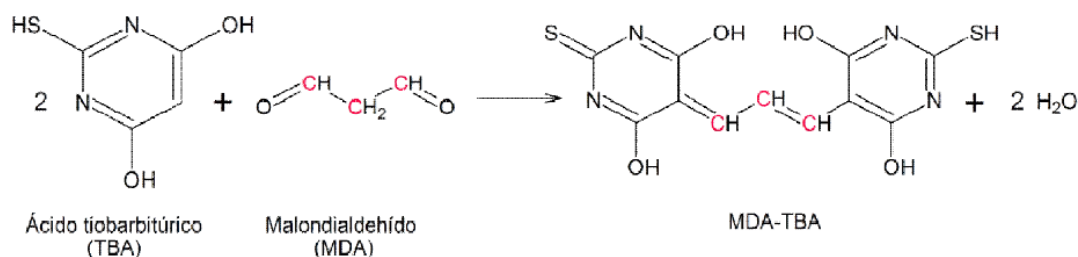


Figura 3.III.6. Esquema representativo de la reacción de cuantificación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

A 1,5 g de muestra se le adicionaron 12 ml de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración de 5% p/v y se mantuvieron en baño de hielo durante 30 min. Luego de esta etapa, las muestras se filtraron con papel de filtro. Posteriormente se agregó a 2 ml de extracto proveniente del filtrado 2 ml de solución de ácido 2-tiobarbitúrico 0,5% p/v (preparada en el día y previamente sonicada para facilitar la disolución del reactivo). Las muestras se incubaron a 70°C durante 30 min en tubos cerrados. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo por disminución de la temperatura y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, Alemania) a 532 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

El índice de TBARS se expresó como los mg de malondialdehído presentes por kg de aceite de nuez, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$TBARS = \left[\frac{Abs \times PM \times 12 \times 1000}{\epsilon \times l \times m} \right] \quad [3.III.3]$$

donde,

Abs es la absorbancia a 532 nm; M es el peso molecular del malonaldehído (72g/mol) utilizando un volumen de extracto de 12 ml; ϵ es el coeficiente de extinción molar del complejo coloreado ($1,56 \times 10^5 \text{ lt mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); l es el camino óptico; m es la masa de muestra

almacenada. La determinación en cada una de las muestras se realizó al menos por triplicado.

3.III.2.3.3.3 Análisis de las muestras mediante ATR-FTIR

Se determinaron los espectros ATR-FTIR de los aceites extraídos de muestras de harina envasadas con películas bicapa o con el sintético. Se emplearon técnicas de análisis quimiométricas de PCA a fin de dilucidar los cambios experimentados en las muestras de harina de nuez envasadas y almacenadas bajo condiciones de humedad y temperatura controlada.

3.III.3 Resultados y discusión

3.III.3.1 Propiedades fisicoquímicas

En el esquema de obtención de las bicapas (Figura 3.III.3) se observa la bicapa formada por el método de termocompresión la cual presentó una buena integridad estructural sin separación de las capas.

En la Tabla 3.III.1 se resumen las propiedades relacionadas con la afinidad por el agua de los sistemas bicapa y de las formulaciones sin el tratamiento térmico. Con fines comparativos y para facilitar la lectura se presentan nuevamente las propiedades de las películas QN_A y QN_B con relación 1:1 estudiadas en la segunda parte del presente Capítulo. Las propiedades de las películas nanocompuestas tal cual ($QN_{A,B}$) y las sometidas al tratamiento por termocompresión ($QN_{AT,BT}$), no exhibieron diferencias significativas ($p>0,05$).

Tabla 3.III.1. Propiedades de afinidad por el agua de las películas individuales y sistemas bicapa

Películas	Humedad (%)	Solubilidad (%)	Hinchamiento (%)	WVP $\times 10^{11}$ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
QN _A -PVA	19,4 (0,6) ^a	23,0 (1,1) ^c	229 (2) ^b	1,55 (0,35) ^a
QN _B -PVA	19,2 (0,7) ^a	19,1 (1,0) ^b	165 (12) ^a	1,0 (0,11) ^a
QN _A	28,1 (0,4) ^b	15,1 (0,4) ^a	278 (23) ^b	11,50 (0,19) ^c
QN _B	28 (2) ^b	13,8 (2,1) ^a	399 (123) ^c	8,44 (0,02) ^b

* Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras.

Como se discutió en la Sección 3.I.4.1 del *Capítulo* las películas nanocompuestas con relación 1:1 no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de humedad. Sin embargo, la formación de las bicapas generó una disminución del contenido de humedad del material, probablemente atribuible a la presencia de una capa de PVA en el sistema y probablemente debido a las interacciones establecidas. Según Villarruel y col. (2015), la disminución del contenido de humedad en películas compuestas de carboximetilcelulosa y PVA se debería a las interacciones establecidas entre los polímeros.

En relación al hinchamiento se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) con la formulación de las películas bicapa. El hinchamiento de los sistemas QN_A-PVA y QN_B-PVA experimentó un descenso con respecto a los nanocompuestos indicando que las interacciones establecidas entre las películas que conforman el sistema permiten generar matrices con baja susceptibilidad a la incorporación de moléculas de agua. Este resultado fue similar al informado por Khan y col. (2016) trabajando con sistemas combinados de PVA y matrices compuestas polietilenglicol/quitosano/gelatina.



Por otra parte, Ferreira y col. (2016) remarcaron que la disminución tanto en la solubilidad como el hinchamiento no sólo depende de las características del polímero o de la composición de las capas que conforman el sistema sino también del proceso de obtención del mismo. En relación a estas determinaciones, conviene resaltar que la determinación de

hinchamiento y la solubilidad de las películas de PVA_T no fue posible debido a su completa solubilización. Estos hallazgos respaldan los mayores valores obtenidos ($p < 0,05$) para los sistemas bicapa.

Como ya se ha discutido en la sección *Resultados y discusión* de la primera parte del presente *Capítulo*, las películas nanocompuestas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de WVP (Tabla 3.III.1). Mientras tanto, la inclusión de una capa de PVA en la formulación de los sistemas bicapa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la permeabilidad al vapor de agua independientemente del tipo de nanocompuesto que conforma el material. Similares resultados fueron encontrados por Rivero y col. (2009) para sistemas bicapas de quitosano y gelatina. Los autores indicaron que la disminución de la WVP sería un indicio de interacciones existentes entre las capas que conforman el sistema. Asimismo, Pereda y col. (2011) informaron la reducción en la WVP de bicapas formadas por quitosano y gelatina indicando que la capa menos permeable controla el fenómeno de difusión. En el presente trabajo, la permeabilidad de los sistemas bicapa estuvo controlada por la capa de PVA (Villaruel y col., 2015), la cual presentó el valor de permeabilidad más bajo del sistema ($1,2 \times 10^{-11} \pm 0,21$) debido a la mayor cristalinidad del material en relación a los nanocompuestos (Lamarra y col., 2018).

Considerando las medidas de ángulo de contacto no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) independientemente de la cara sobre la cual se realizó la determinación (capa de Q o de PVA) (Tabla 3.III.2). Estos resultados fueron opuestos a los observados por Kurek y col. (2014), quienes trabajando con bicapas compuestas por proteínas de suero (WP) y quitosano, observaron que al analizar el ángulo de contacto de la capa de WP la superficie era más hidrofílica.

Tabla 3.III.2 Angulo de contacto de las películas bicapa

Película	Angulo de contacto (°)		
	Cara PVA	Cara QN	
QN _A -PVA	89,7 (7,8) ^a	95,3 (9,5) ^a	
QN _B -PVA	96,6 (4,7) ^a	104,9 (6,0) ^a	

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras.

Por su parte, la formación de bicapas generó matrices más hidrofóbicas, traducido en mayores valores de ángulo de contacto para ambas formulaciones. Este comportamiento fue análogo al observado por diversos autores (Ferreira y col., 2016; Kurek y col., 2014) quienes afirmaron que el aumento en la hidrofobicidad de la matriz fue producto de la migración del glicerol desde la capa de quitosano hacia el otro material polimérico que compone el sistema. Si bien es este estudio no se utilizó glicerol como agente plastificante una hipótesis sería que el uso de PVA con propiedades adhesivas y la temperatura del proceso harían factible la plastificación del sistema por la capacidad de fluir del PVA que ingresa en forma líquida. El aumento de la hidrofobicidad de los materiales bicapas puede deberse a que durante la formación de las mismas se producen transformaciones en la matriz de Q generando así el cambio en el ángulo de contacto (Ritthidej y col., 2012; Vasconcellos y col., 2011).

3.III.3.2 Propiedades ópticas

En la Figura 3.III.7 se muestran los espectros en la región UV de películas nanocompuestas y sus correspondientes sistemas bicapa. La capacidad de barrera a la radiación UV no mostró diferencias entre las muestras bicapas ensayadas ($p > 0,05$) (Tabla inserta en Figura 3.III.7). Sin embargo, los espectros de las bicapas evidenciaron una mejora en comparación

con los correspondientes nanocompuestos. Resultados similares fueron informados por Rivero y col. (2010) estudiando matrices de quitosano modificadas con ácido tánico y sometidas a tratamientos térmicos a diferentes temperaturas. En el presente caso, no obstante el tratamiento térmico efectuado a menor temperatura (77°C), podría haberse generado un efecto de curado debido a la acción entrecruzante del ácido gálico libre presente en la matriz.

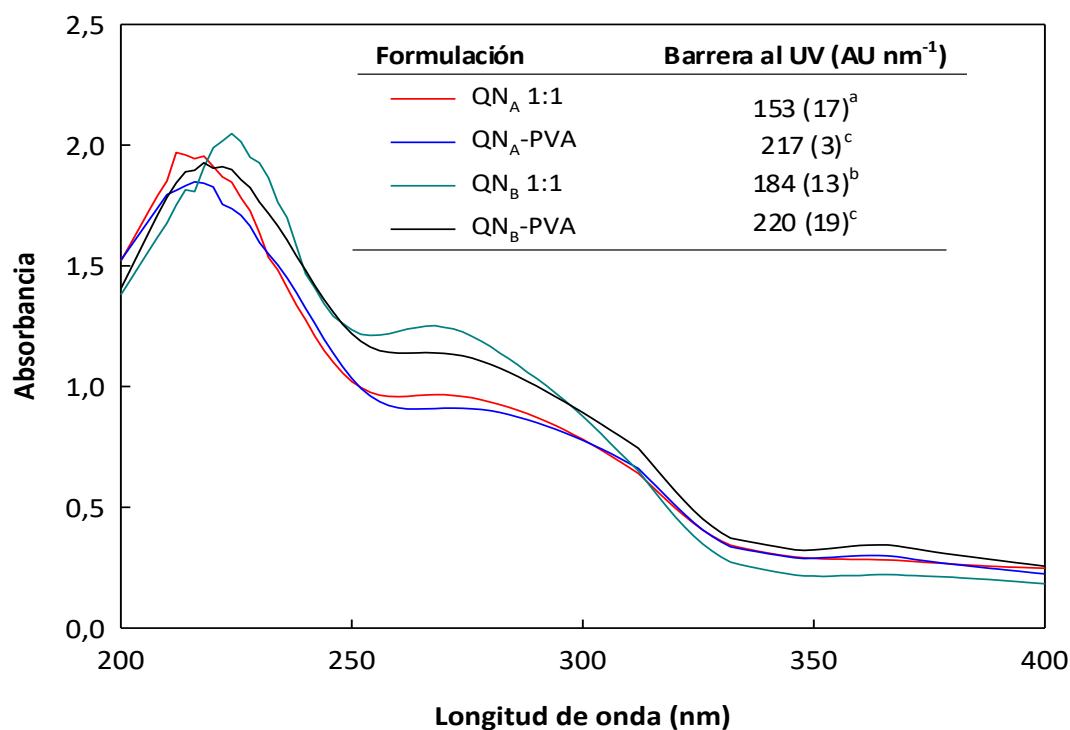


Figura 3.III.7. Espectros de la región UV de las películas nanocompuestas y sistemas bicapa.

A partir del análisis de los parámetros de color de cada una de las caras que conforman el sistema no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las mismas. Por otra parte, tampoco los parámetros de los sistemas bicapa mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al correspondiente nanocompuesto individual (Tabla 3.III.3).

Tabla 3.III.3. Parámetros de color de los nanocompuestos y sistemas bicapa

Películas	L [*]	b [*]	ΔE	BI
QN _A -PVA	71,9 (0,9) ^b	20,6(0,6) ^a	43,6 (0,9) ^b	69,5 (0,7) ^a
QN _A 1:1	74,4 (0,9) ^b	19,1 (1,5) ^a	41,7 (0,7) ^b	63,8 (0,7) ^a
QN _B -PVA	67,5 (0,6) ^a	25,7 (1,0) ^b	39,2 (1,6) ^{a,b}	75,1 (0,2) ^b
QN _B 1:1	66,5 (0,6) ^a	25,6 (0,7) ^b	35,5 (0,6) ^a	75,2 (4,0) ^b

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestras.

3.III.3.3 Propiedades mecánicas

A partir de los perfiles mecánicos de los sistemas bicapa se observó que estas matrices presentaron valores de esfuerzo mayores en relación a las películas nanocompuestas (Figura 3.III.8 a).

Esto podría deberse a la interacción existente entre los grupos amino y -OH disponibles del Q y los grupos -OH del PVA, resultados previamente corroborados por FTIR. Khan y col. (2016) explicaron la existencia de este tipo de interacciones en bicapas de gelatina y PVA, remarcando que la interacción entre los grupos amino y los grupos -OH del PVA se debe a que el H de este último actúa como aceptor de electrones, en tanto que los grupos amino actúan como donadores induciendo una interacción de tipo dipolo-dipolo, aumentando así la interacción molecular.

Los valores de elongación de los sistemas bicapa fueron más bajos que los obtenidos para los nanocompuestos (Figura 3.III.8 b). Similares resultados fueron encontrados por Valencia-Sullca y col. (2018) para bicapas de almidón termoplástico y quitosano obtenidas por termocompresión. Los autores atribuyeron la menor elongación a las interacciones establecidas en la interface entre los polímeros. Asimismo, Ferreira y col. (2016) informaron valores de elongación y esfuerzo a la ruptura intermedios entre los de Q y FucoPol, polímeros que conforman cada una de las capas del sistema.

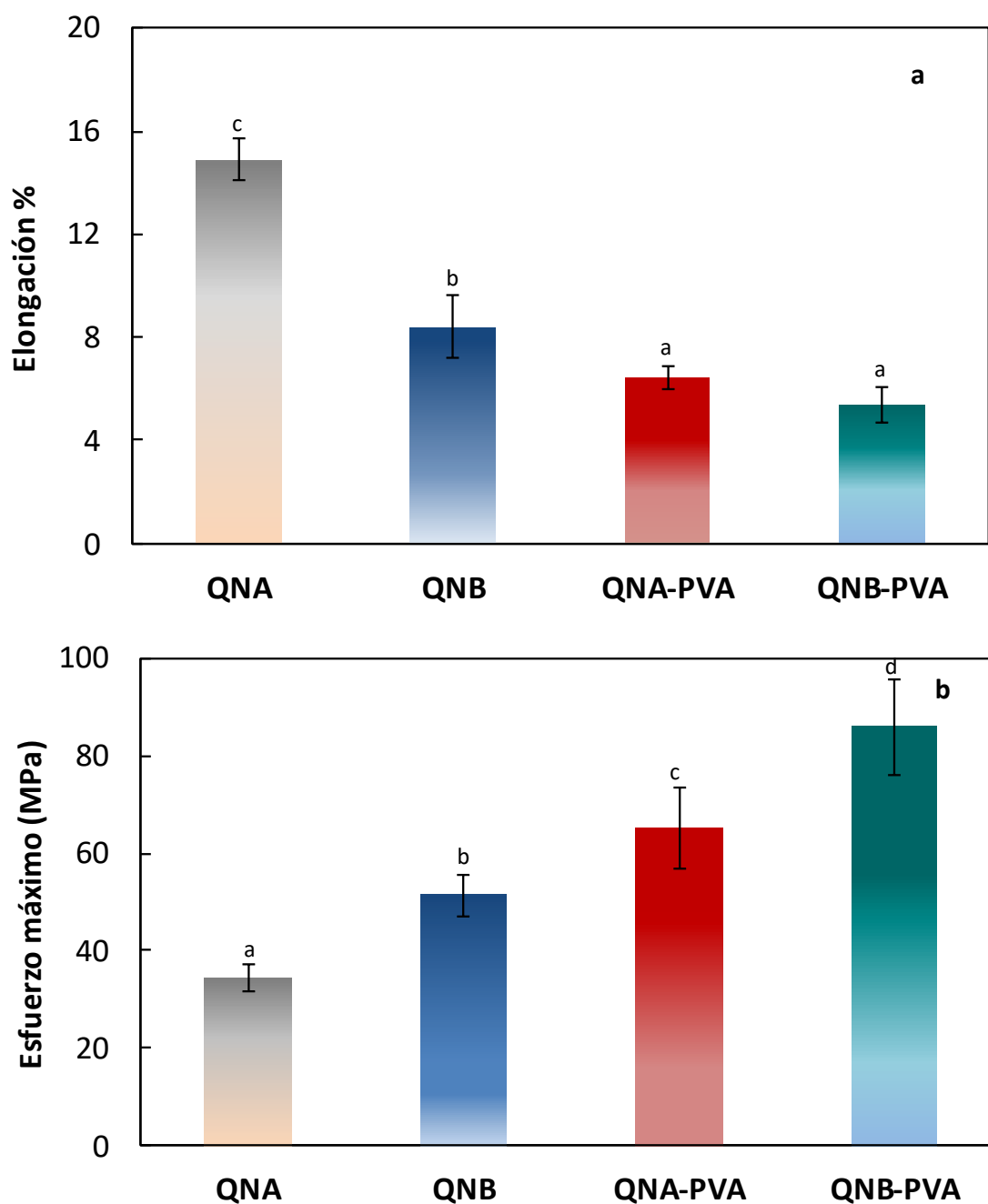


Figura 3.III.8. Propiedades mecánicas de películas nanocompuestas y de sistemas bicapa: **a)** elongación porcentual; **b)** esfuerzo a la ruptura.

Cabe destacar que para la selección del sistema bicapa a utilizar en el envasado de harina de nuez es conveniente realizar un análisis global del comportamiento del material. En relación a las propiedades relacionadas con la afinidad por el agua las bicapas no difieron entre si excepto que la matriz QN_A-PVA exhibió una mayor capacidad de hinchamiento, parámetro relevante en sistemas de liberación controlada. Por otra parte, del análisis de las respuestas mecánicas obtenidas, los sistemas bicapas QN_B-PVA exhibieron los mayores valores de esfuerzo los que se correspondieron con una matriz muy rígida dificultando su manipulación como material de envase. Por lo expuesto, la formulación QN_A-PVA fue seleccionada para su posterior aplicación en el envasado de harina de nuez

3.III.3.4 Análisis térmico por MDSC

El termograma de PVA_T mostró una transición endotérmica observada a 203°C atribuida a la fusión de la fase cristalina. Asimismo, el termograma de los sistemas bicapa exhibió una transición endotérmica asignada al PVA y otro evento relacionado a las interacciones entre el quitosano y el ácido gálico inducido por la acción combinada del calor y la presión aplicada.

A partir de los termogramas, se determinó el grado de cristalinidad (GC) correspondiente a la capa de PVA. El GC se estimó a partir de la relación entre la entalpía de fusión (ΔH) obtenida por integración del área bajo la endoterma de fusión y el valor de entalpía informado en literatura para un PVA 100% cristalino $\Delta H_0 = 161,6 \text{ J g}^{-1}$ (Kubo y col., 2003; Yang y col., 2016) (Ecuación 3.III.3).

$$GC = \frac{\Delta H_{fPVA}}{161} \times 100 \quad [3.III.3]$$

donde,

GC es el grado de cristalinidad del PVA y 161 (J g^{-1}) es la entalpía de fusión de un PVA 100% cristalino (Kubo y col., 2003).

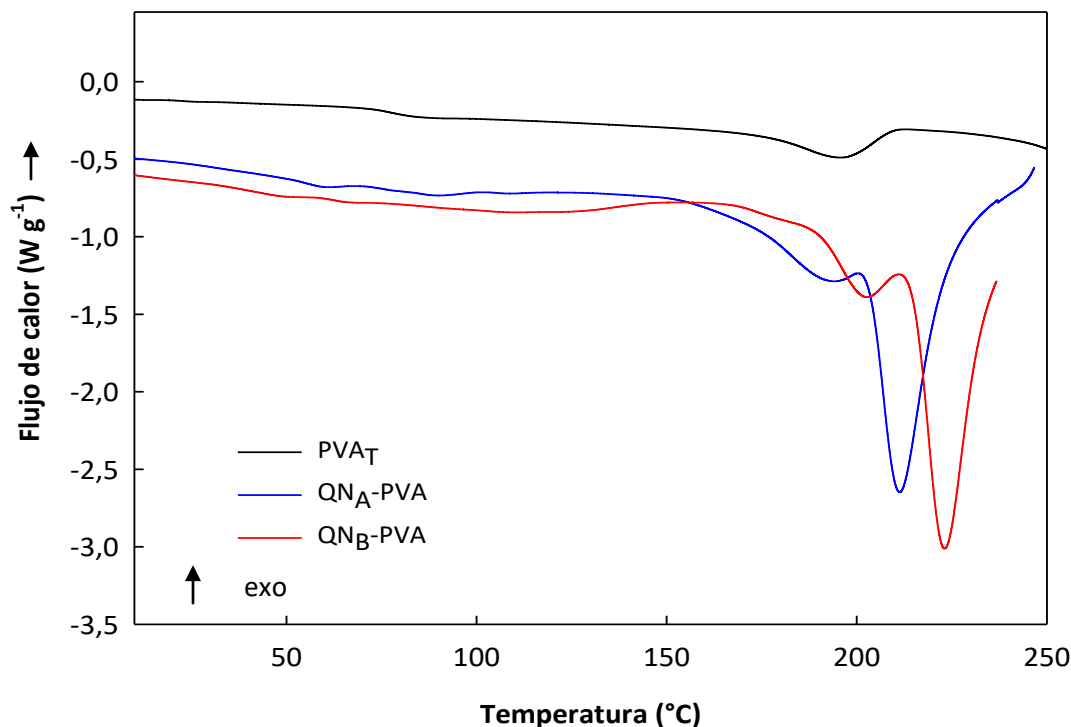


Figura 3.III.9. Termogramas obtenidos por DSC de las bicapas y de la muestra control PVA_T , en el intervalo de temperaturas entre 0 y 250 $^{\circ}\text{C}$. El barrido de la muestra PVA_T es el correspondiente al segundo calentamiento para poder observar sin interferencias la fusión de este polímero.

En la Tabla 3.III.4 se presentan los parámetros térmicos determinados a partir de los termogramas de las distintas muestras (bicapas y PVA_T). Como puede observarse la formación de bicapas no modificó significativamente ($p > 0,05$) la temperatura de fusión del PVA. Sin embargo, se detectó una disminución en la entalpía asociada a esta transición y por ende del grado de cristalinidad con la formación de los sistemas bicapas. Esta disminución resultó menos relevante en el caso de la muestra $\text{QN}_B\text{-PVA}$.

Tabla 3.III.4. Temperatura, entalpía de fusión y grado de cristalinidad de películas PVA_T y sistemas bicapa

Película	T _p (°C)	ΔH _p (J g ⁻¹)	GC (%)
PVA _T	203 (10) ^a	24 (3) ^c	18 (0,6) ^c
QN _A -PVA	195 (9) ^a	6 (3) ^a	4 (2) ^a
QN _B -PVA	202 (7) ^a	19 (1) ^b	12 (1) ^b

*Distintos subíndices indican diferencias significativas entre muestras (p<0,05)

Del análisis de la etapa de enfriamiento de las curvas obtenidas mediante MDSC, se detectó una transición exotérmica asociada a la cristalización del PVA (Figura 3.III.10), observando un corrimiento del pico hacia temperaturas más bajas y una disminución en el valor de entalpía asociada a las matrices bicapa (Figura 3.III.10 y Tabla 3.III.5). De acuerdo a las investigaciones realizadas por Kumar y col. (2010), esta disminución se podría atribuir a una buena compatibilidad entre el quitosano y el PVA. Estos autores remarcaron que las moléculas de PVA pueden interactuar con las cadenas de quitosano formando así una estructura altamente entrecruzada en matrices obtenidas por la técnica de moldeo y deshidratación. Según Villarruel y col. (2015) un cambio en la estructura cristalina puede deberse a interacciones polímero-polímero establecidas en la fase amorfa, creando así un desorden de los cristales con la consecuente disminución en la entalpía de cambio de fase.

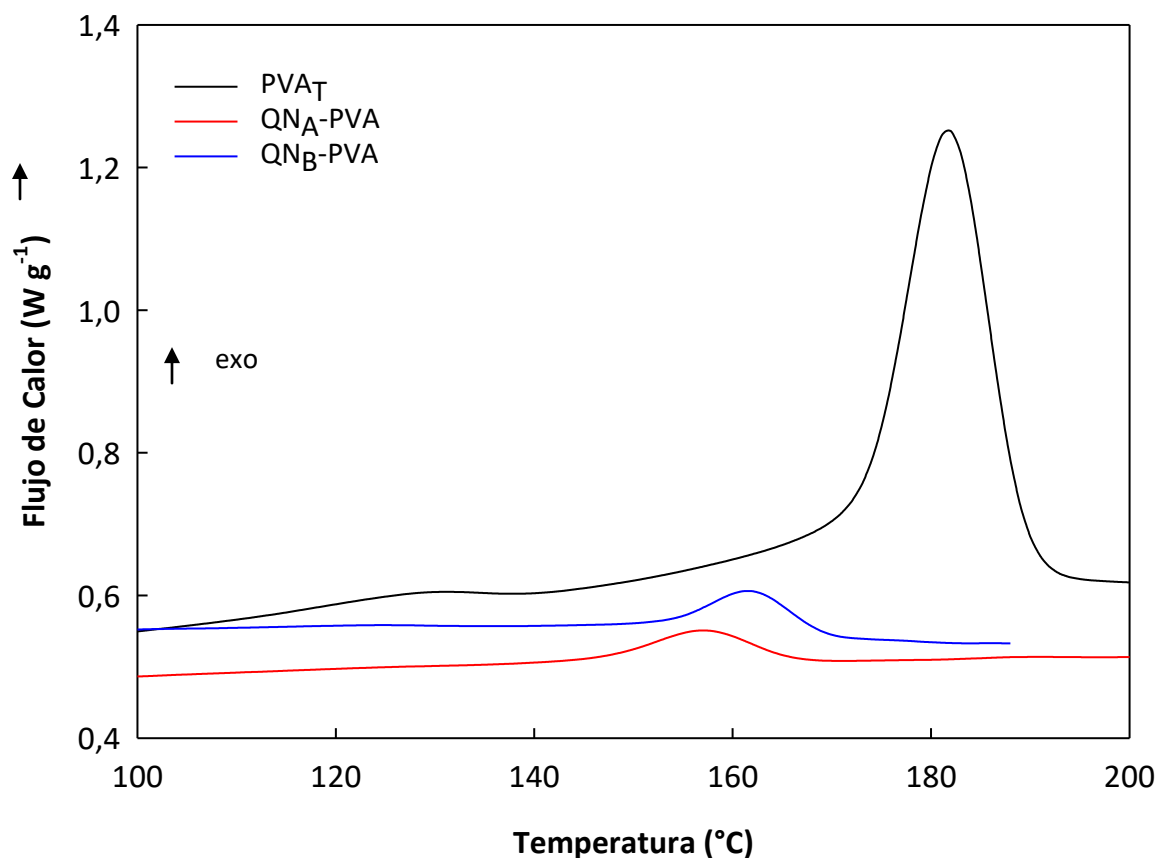


Figura 3.III.10. Termogramas obtenidos por MDSC de los sistemas bicapa y de las películas tratadas con termocompresión, mostrando la etapa de enfriamiento.

Tabla 3.III.5. Análisis térmico de películas nanocompuestas, bicapas y control de PVA_T sometidas a tratamiento térmico

Formulación	T _c (°C)	ΔH _c (J g ⁻¹)	T _{g1} (°C)	T _{g2} (°C)	T _{g3} (°C)
QN _A -PVA	154 (4,1) ^a	4,1(1,0) ^a	55 (0,5) ^b	74 (1,5) ^b	91 (0,5) ^a
QN _B -PVA	161 (1,0) ^a	4,3 (0,9) ^a	47 (1,3) ^a	66 (1,2) ^a	91 (0,8) ^b
PVA _T	182 (2,5-) ^b	43,9(1,5) ^b	-	78 (4,0) ^c	-
QN _A	-	-	45 (1,4) ^a	-	91 (2,1) ^a
QN _B	-	-	43 (2,2) ^a	-	94 (3,1) ^a

*Distintos subíndices indican diferencias significativas entre muestras (p<0,05)

Otra forma de poner en evidencia la compatibilidad de materiales poliméricos es a través de la variación de la temperatura de transición vítrea (T_g). Como puede observarse en la Figura 3.III.11, el PVA exhibió una T_g alrededor de 80°C, valor similar al encontrado por Naduparambath y col. (2018). Estos autores informaron que la T_g del PVA puede variar entre 58 y 85°C dependiendo de diversos factores tales como grado de hidrólisis, grado de polimerización, entre otros.

Como se ha discutido previamente en la segunda parte del presente *Capítulo* las películas nanocompuestas exhibieron dos transiciones asociadas a las T_g del quitosano localizadas alrededor de 45 y 90°C.

Por otra parte, los sistemas bicapa exhibieron tres valores de T_g , lo que indicaría la preservación de la identidad microestructural de cada uno de los componentes ensamblados. Sin embargo, se observaron modificaciones en los valores de la T_g asociada al PVA probablemente debido a la existencia de interacciones entre ambos polímeros (Figura 3.III.11). Kubo y col. (2003) identificaron dos T_g en matrices de PVA reforzadas con lignina sugiriendo que la modificación de la T_g del PVA podría indicar compatibilidad entre los componentes del sistema.

En el presente trabajo de Tesis resulta válido destacar que los sistemas bicapa poseen una superficie de contacto entre una película a base de quitosano y otra de PVA, que no forman una mezcla. Por lo tanto, la aparición de tres valores de T_g resulta lógico, dos de ellas asociadas al quitosano y una transición atribuida a la fase del PVA.

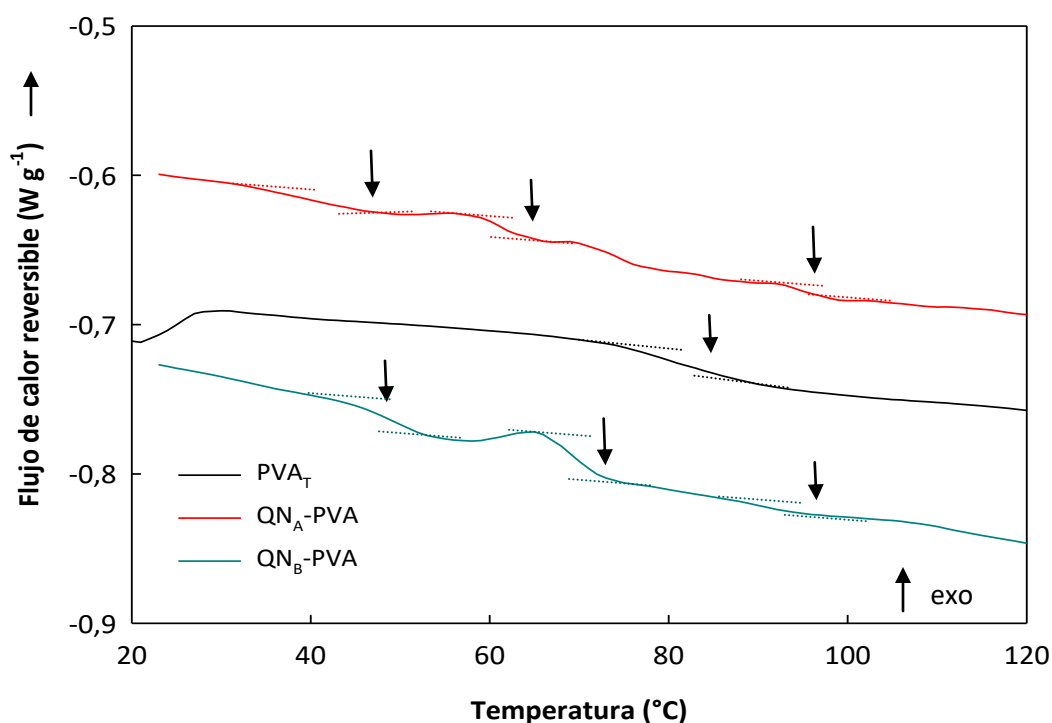


Figura 3.III.11. Termogramas de las películas de PVA_T , los nanocompuestos y las bicapa. En el gráfico se indica las T_g como el cambio registrado en la señal de flujo de calor reversible.

3.III.3.5 FTIR y análisis quimiométricos por PCA

En la Figura 3.III.12 se presentan los espectros ATR-FTIR de PVA, Q y la bicapa $\text{QN}_A\text{-PVA}$ obtenidas sobre la cara del PVA ($\text{QN}_A\text{-PVA/PVA}$) y del Q ($\text{QN}_A\text{-PVA/Q}$). Como es bien conocido, el PVA presenta una banda en la región 3500 y 3000 cm^{-1} característica del estiramiento de los grupos OH del polímero (Bonilla y col., 2014, Naduparambath 2018; Villaruel y col., 2015). Las bandas de absorción a 2932 y 2906 cm^{-1} se asignan a las vibraciones de tensión C-H de la cadena alifática (Bonilla y col., 2014) mientras que el pico a 1750 cm^{-1} (no mostrado) corresponde al estiramiento del C=O del grupo acetato (Zhang y col., 2013).

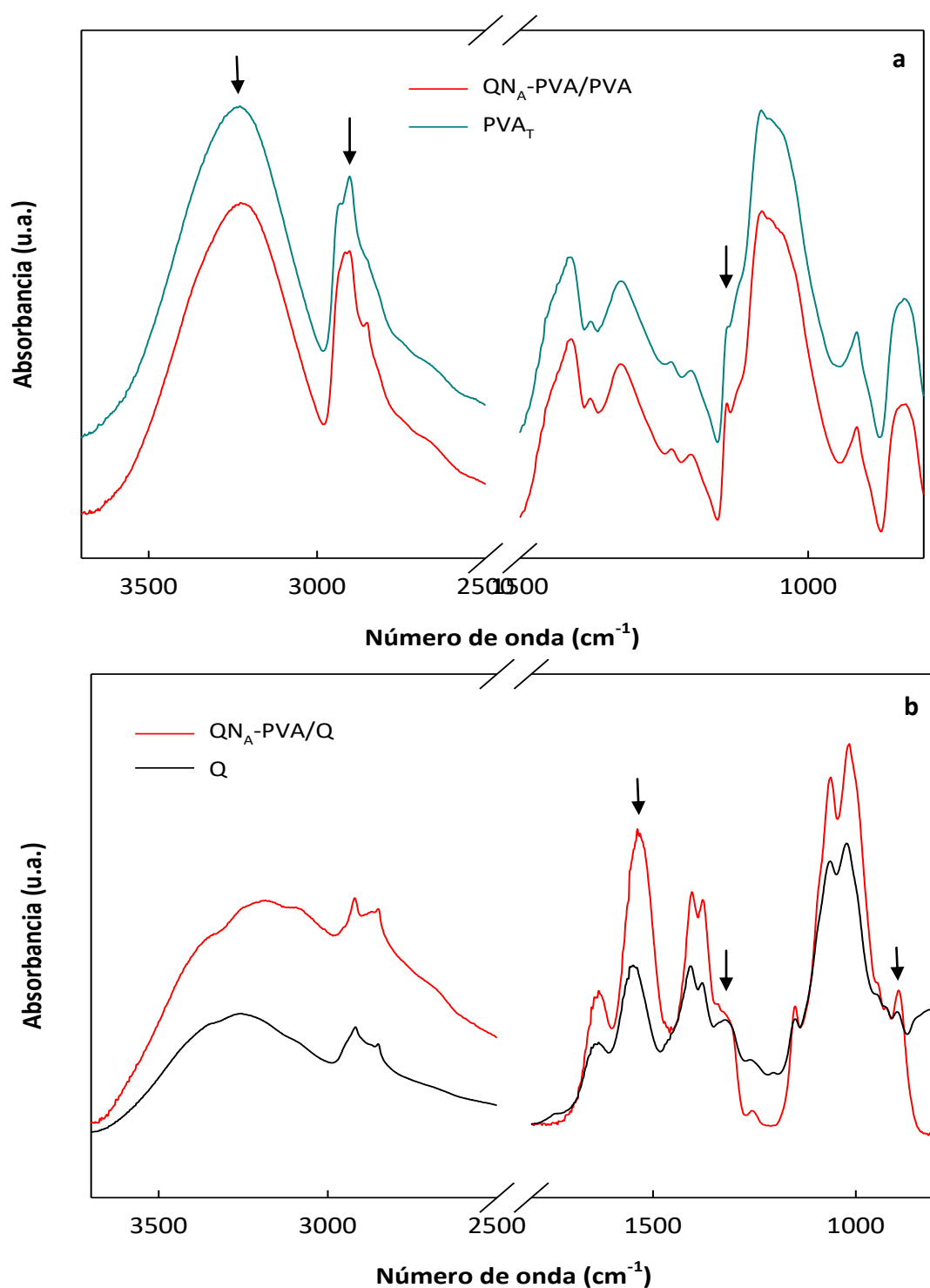


Figura 3.III.12. Espectro obtenido por ATR-FTIR de: **a)** PVA y sistemas bicapa QN_A -PVA del lado del PVA; **b)** Q y sistema bicapa QN_A -PVA del lado del Q, región espectral 3500- 1000 cm⁻¹. Sistemas analizados de la cara del PVA.

El espectro ATR-FTIR del sistema bicapa obtenido del lado del PVA mantuvo los picos característicos de este polímero mientras que el espectro del lado del nanocompuesto fue muy semejante al de quitosano. Es decir, que cada capa, a pesar de las interacciones probadas por la aplicación de diferentes técnicas, mantuvo su identidad superficialmente.

A modo de ejemplo se muestra el espectro resultante de los sistemas bicapa del lado del PVA (QN_A-PVA/PVA) el cual exhibió un corrimiento de la banda localizada a 3230 hacia menores números de onda (3220 cm^{-1}) con respecto localizada a 3230 hacia menores números de onda (3220 cm^{-1}) con respecto a la película de PVA, lo cual podría atribuirse a interacciones existentes entre los grupos -OH del PVA y los grupos amino del Q (Bonilla y col., 2014). Cambios evidentes se produjeron en la región espectral del 2900 cm^{-1} y la transformación de un hombro del PVA en un pequeño pico ubicado a 1140 cm^{-1} . También se observaron modificaciones en la banda ubicada 1142 cm^{-1} adscripta al estiramiento de grupos que conforman la estructura cristalina del PVA (Zhang y col., 2013)

Analizado el mismo sistema del lado del nanocompuesto, la banda ubicada a 1551 cm^{-1} del Q experimentó un corrimiento a 1533 cm^{-1} asociada a la amida II, corroborando la existencia de interacciones entre los grupos amino del quitosano y los -OH del PVA. El pico localizado a 1317 cm^{-1} del Q se transformó en un hombro en el sistema bicapa y se observaron los cambios ya mencionados en la banda a 900 cm^{-1} .

En la Figura 3.III.13 se muestra la región espectral $2000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ obtenida por FTIR donde se puede observar un pequeño pico ubicado a 1747 cm^{-1} , probablemente debido a la formación de una unión éster como consecuencia del proceso de termocompresión. Es importante mencionar que esta banda no fue visible en los espectros obtenidos mediante ATR-FTIR.

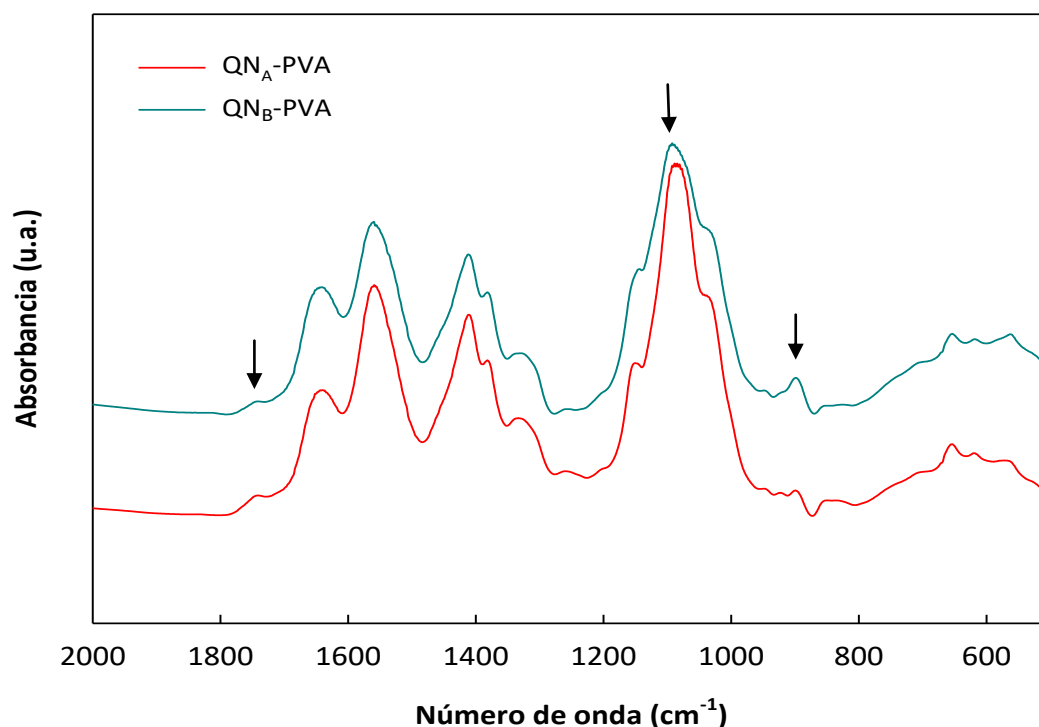


Figura 3.III.13. Espectro obtenido por FTIR de los sistemas bicapa $\text{QN}_A\text{-PVA}$ y $\text{QN}_B\text{-PVA}$, región espectral 2000-600 cm^{-1} .

Con el objetivo de establecer diferencias entre las muestras, se llevaron a cabo análisis quimiométricos de PCA. Se introdujeron en el análisis los espectros de los nanocompuestos sometidos al proceso de termocompresión sin la presencia de la capa de PVA.

El análisis de PCA de todas las muestras permitió inferir que la varianza fue explicada mayormente por 2 PCs para las regiones estudiadas. En el caso de la región comprendida entre 1400 y 1750 cm^{-1} , se produjo la separación en distintos *clusters* o grupos, exteriorizando la existencia de diferencias significativas entre las muestras en la región de estudio (Figura 3.III.14)

Como puede verse en la Figura 3.III.14 la muestra sometida a un tratamiento térmico con presión (QN_{BT}) también evidenció diferencias con respecto a la película nanocompuesta sin

tratamiento (QN_B), tal como fue explicado por Ritthidej y col. (2002). Estos autores afirmaron que al aumentar la temperatura de curado se generan enlaces amida en películas de quitosano, tratadas a 70°C a una humedad controlada. Martínez Urreaga y de la Orden (20070) encontraron que el calentamiento puede provocar la desaparición de los grupos amino modificando la señal de FTIR característica de estos grupos. Este resultado está relacionado con la disminución de la hidrofiliidad de las bicapas observado en las medidas de ángulo de contacto.

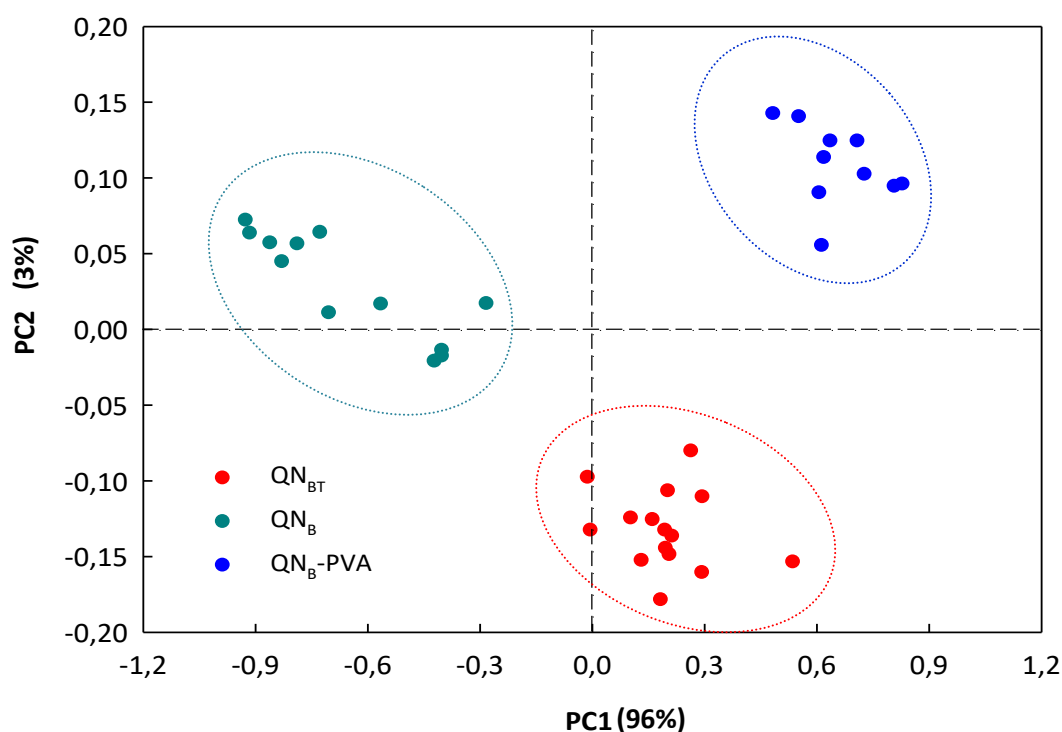


Figura 3.III.14. Gráfico biplot de las muestras QN_B , QN_B -PVA/Q y QN_{BT} . Región espectral 1400-1750 cm^{-1}

El gráfico *biplot* de PCA correspondiente a la región espectral entre 1400 y 1750 cm^{-1} de muestras analizadas sobre la cara de deposición del PVA (Figura 3.III.15) mostró la separación de los sistemas bicapa con respecto al control de PVA, confirmando la atenuación de la señal correspondiente al enlace C=C.

Entre los sistemas bicapa QN_A -PVA y QN_B -PVA no se observaron diferencias significativas. Asimismo, se analizó la región $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ de la banda perteneciente a los grupos -OH del PVA (Figura 3.III.16) evidenciando nuevamente una separación entre las distintas muestras lo que indicaría la interacción antes mencionada entre los grupos amino del Q y los -OH del PVA. Resultados similares fueron observados por Yang y col. (2018) quienes obtuvieron a través de electrohilado una mezcla compuesta por quitosano, PVA y óxido de grafeno y asignando esta tendencia a una interacción entre ambos componentes. Asimismo, observaron una modificación de la banda de estiramiento de C-H.

Los análisis quimiométricos confirmaron las interacciones establecidas entre los componentes de los sistemas bicapa debido a la separación de las muestras en *clusters*. Estos hallazgos corroboraron los resultados observados mediante MDSC. La disminución en el GC estimado a partir de los termogramas, así como los desplazamientos de la T_g podría relacionarse con la existencia de interacciones entre los componentes de los polímeros que conforman la bicapa. Una explicación similar fue propuesta por Yang y col. (2018).

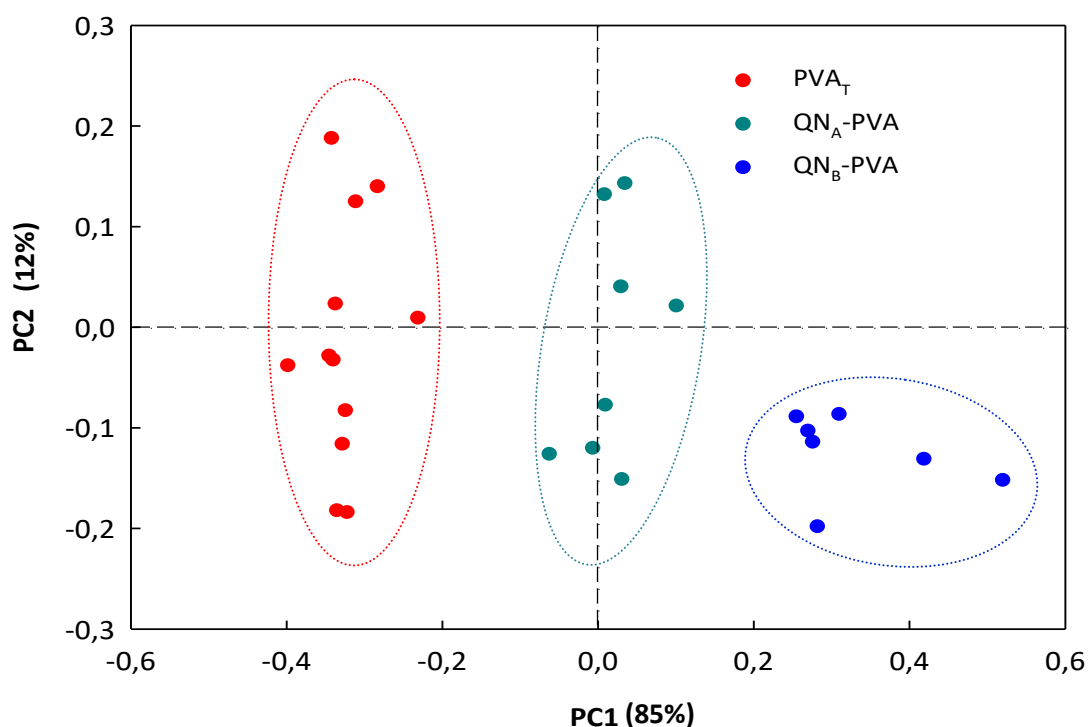


Figura 3.III.15. Gráfico biplot de sistemas bicapa y de PVA_T , región espectral $1400\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$.

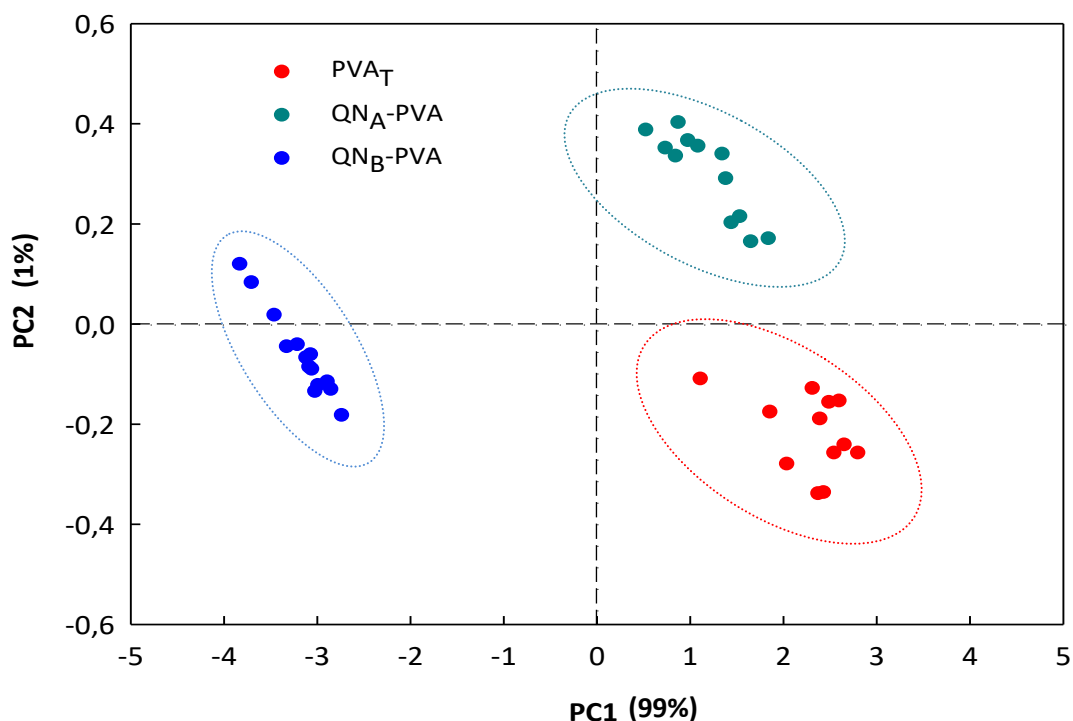


Figura 3.III.16. Gráfico biplot de sistemas bicapa y de PVA_T, región espectral: 3000- 3500 cm⁻¹.

3.III.3.6 Análisis microestructural

En las micrografías obtenidas por SEM (Figura 3.III.17 y 3.III.18) se pudieron discernir dos regiones definidas en los sistemas bicapa, una capa característica de las películas nanocompuestas de quitosano (Lamarra y col., 2018) y otra correspondiente a la capa de PVA.

Asimismo, el análisis microestructural reveló la existencia física de las dos regiones definidas que permanecen unidas a nivel de interfase, confirmando las interacciones establecidas entre los componentes del sistema. Estos resultados están en concordancia con los resultados demostrados mediante otras técnicas. Similares resultados fueron encontrados por Pereda y col. (2011) y por Ferreira y col. (2016).

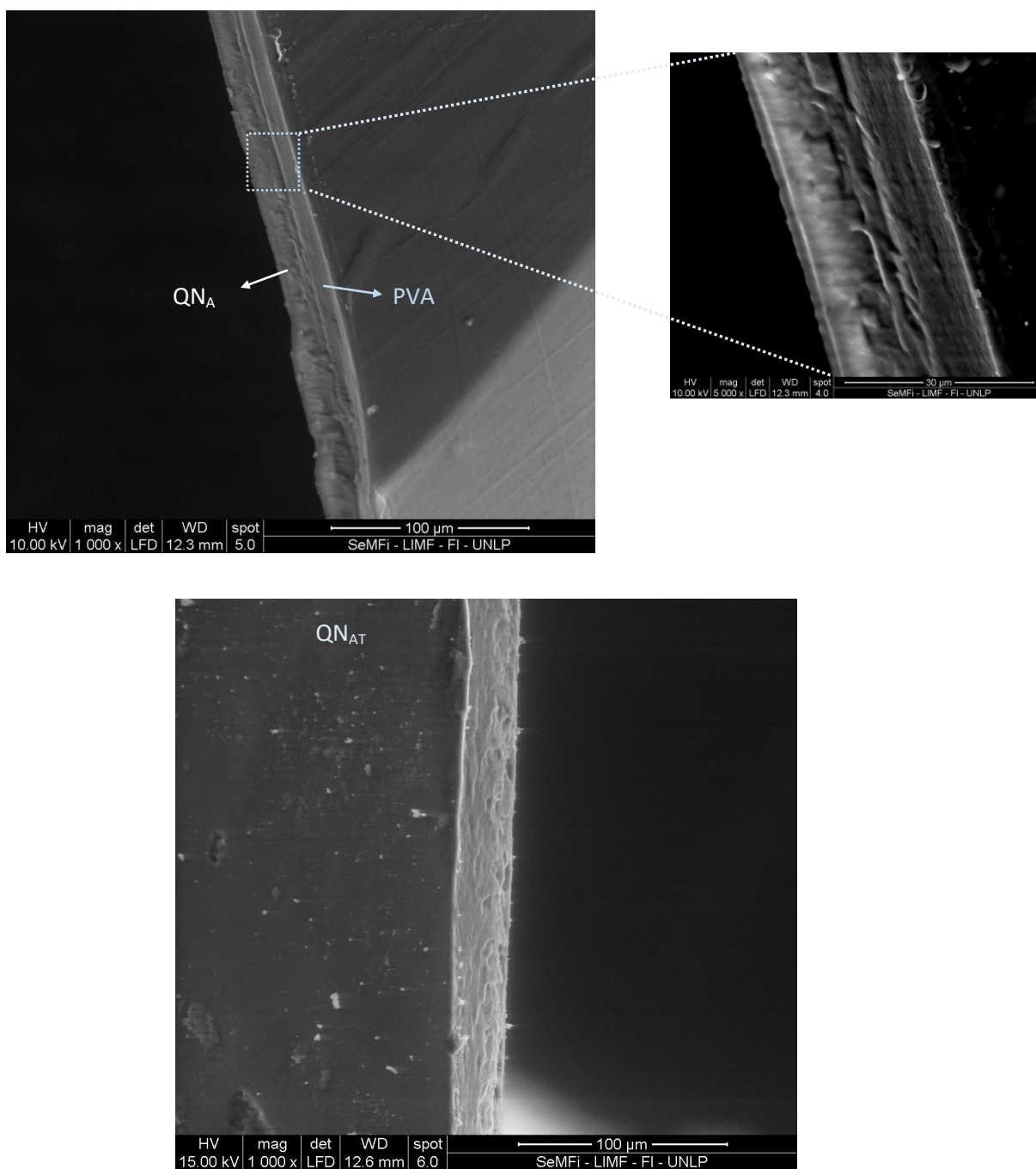


Figura 3.III.17. Micrografía de SEM de la bicapa QN_A-PVA y región amplificada, y nanocompuesto sometido a termocompresión (QN_{AT}). Magnificación 1000x y 5000x.

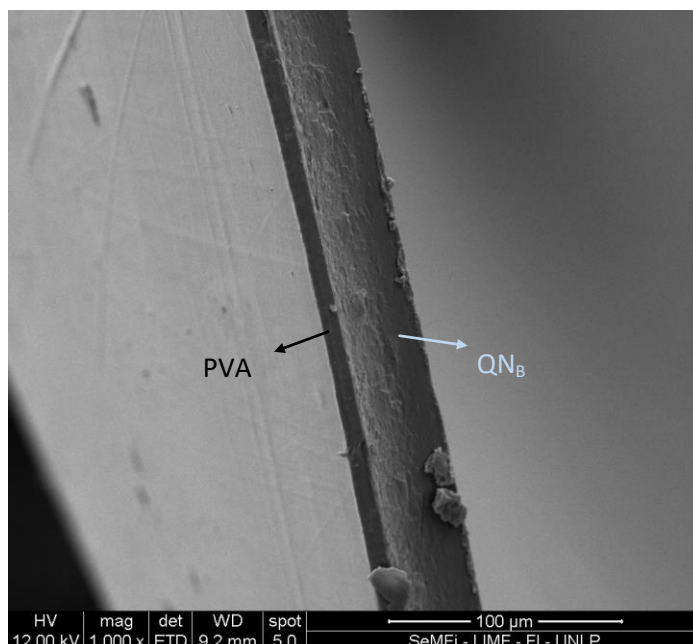


Figura 3.III.18. Micrografía de SEM de la bicapa QNB-PVA. Magnificación 1000x.

De las micrografías se distinguen los espesores de cada una de las capas que conforman el sistema. El espesor de la película bicapa (QNA-PVA) prácticamente coincide con el del nanocompuesto tratado térmicamente (QNT). La disminución en el espesor podría indicar un efecto plastificante de la matriz por acción del PVA que tiene lugar durante la formación de las bicapas por termocompresión. Estos resultados podrían atribuirse a que la temperatura del proceso es superior a la T_{g1} del polímero y al efecto combinado que produce el tratamiento térmico con la presión (Ortega-Toro y col., 2015).

3.III.3.7 Capacidad antimicrobiana de los sistemas bicapa

Los ensayos de capacidad antimicrobiana revelaron que los sistemas bicapa mostraron halos de inhibición alrededor de las películas ($34 \pm 7\%$), frente al desarrollo de *E. coli* 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹. Estos resultados confirman que después del procesamiento por termocompresión los materiales conservaron su capacidad antimicrobiana si bien los sistemas se tornaron más hidrofóbicos y la zona de contacto con el medio de cultivo no fue total.

Por otra parte, en los ensayos de capacidad antimicrobiana frente a *S. aureus* (Figura 3.III.20) las películas exhibieron una inhibición por contacto al igual que la película nanocompuesta tal como se discutió en la primera parte del presente *Capítulo*.

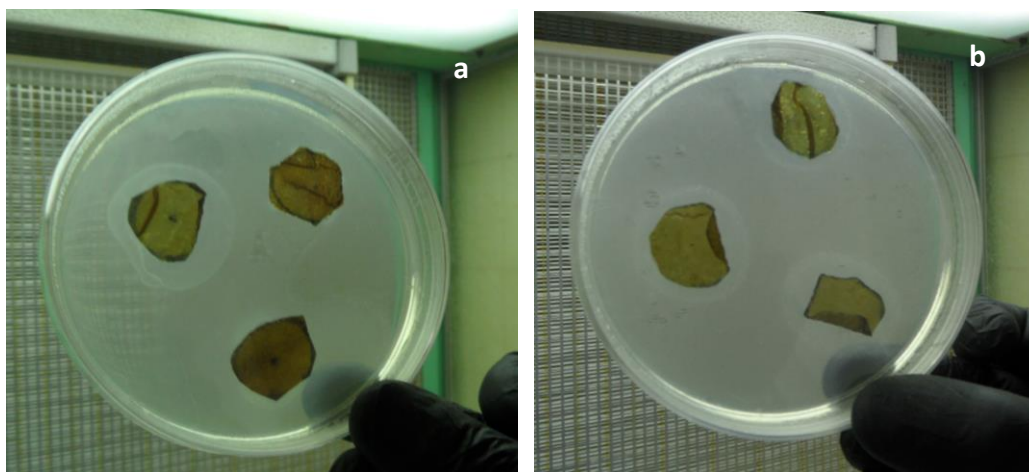


Figura 3.III.19. Capacidad antimicrobiana del sistema bicapa QN_A-PVA frente a *E.coli*, mostrando la formación del halo de inhibición: **a)** inóculo 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹; **b)** inóculo 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹.



Figura 3.III.20. Capacidad antimicrobiana de las películas bicapa QN_A-PVA frente a *S. aureus* (inóculo 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹).

3.III.3.8 Aplicación de los sistemas bicapa

El aceite de nuez contiene aproximadamente un 7% de ácidos grasos saturados, un 20% de monoinsaturados y un 73% de ácidos grasos poliinsaturados; estos altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados hacen que las nueces sean productos propensos a la oxidación. Esta composición convierte a la harina en un producto susceptible de sufrir oxidación y por lo tanto con una vida útil limitada, especialmente si se considera la mayor superficie expuesta al aire (Vanhanen y Savage, 2006). Esto podría llevar a un aumento de los procesos oxidativos durante el almacenamiento de la muestra. Las muestras de harina utilizadas para envasar presentaron un contenido de lípidos determinado mediante el método de Soxhlet del $29\pm 0,14\%$ y un valor de humedad del $7,14\pm 0,02\%$.

Temperatura, luz, humedad y la exposición al oxígeno son los principales factores que contribuyen a los procesos de oxidación. La concentración de oxígeno es considerada el factor inductor de la oxidación lipídica más importante. En este sentido, se han llevado a cabo varias estrategias para preservar la calidad del producto. Se estudiaron diferentes maneras para disminuir el efecto del oxígeno a través de atmósferas modificadas, envases con bajos niveles de oxígeno (compuestos principalmente por nitrógeno y dióxido de carbono), envasado al vacío, o el uso de absorbedores de oxígeno (Jensen y col., 2003; Pastorelli y col., 2007), entre otros. En la misma línea, la disponibilidad de oxígeno en el producto envasado también se puede controlar mediante el uso de materiales de barrera al oxígeno (Mexis y col., 2009) o mediante el empleo de recubrimientos (Kang y col., 2013). Independientemente de la estrategia utilizada, es esencial minimizar el contacto de oxígeno con la nuez o harina de nuez a fin de prolongar su vida útil.

La auto-oxidación es el proceso más común que lleva al deterioro oxidativo y consiste en la reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos (Vanhanen y Savage, 2006). Otro proceso que desencadena el deterioro oxidativo es la foto-oxidación, una ruta alternativa que conduce a la formación de hidroperóxidos, en lugar de los mecanismos de radicales libres. La prevención de la ocurrencia de procesos oxidativos durante el

procesamiento y el almacenamiento de alimentos adquiere una importancia fundamental para mantener la seguridad y la calidad de los productos alimenticios.

En condiciones de presión normal de oxígeno, el radical alquilo reacciona rápidamente con el oxígeno para formar el radical peróxido. Este sustrae un átomo de hidrógeno a otra molécula de ácido graso para formar un hidroperóxido y un nuevo radical alquilo libre desencadenando un proceso de auto-oxidación (Fennema, 1992).

En el presente trabajo de Tesis, el proceso de autooxidación fue considerado una de las principales vías de alteración de los lípidos presentes en muestras de harina de nuez envasadas en materiales bicapa y envases control (sintético) y almacenadas bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

Independientemente de la temperatura de almacenamiento de las muestras envasadas, se observó que los sistemas bicapa obtenidos por deposición de una capa de PVA y una nancompuesta de Q funcionalizada con ácido gálico preservaron la estabilidad oxidativa de los lípidos del producto envasado (Figura 3.III.21).

En los envases control la concentración de hidroperóxidos aumentó gradualmente hasta alcanzar un valor máximo después de 78 días de almacenamiento a 20°C. Transcurrido ese tiempo la cinética de formación de peróxidos comenzó a disminuir alcanzando valores cercanos a los iniciales después de 105 días de almacenamiento. Estos cambios manifiestan la ocurrencia de una etapa de descomposición de peróxidos con formación de productos de oxidación secundaria detectados con el índice de TBARS (Figura 3.III.21 a).

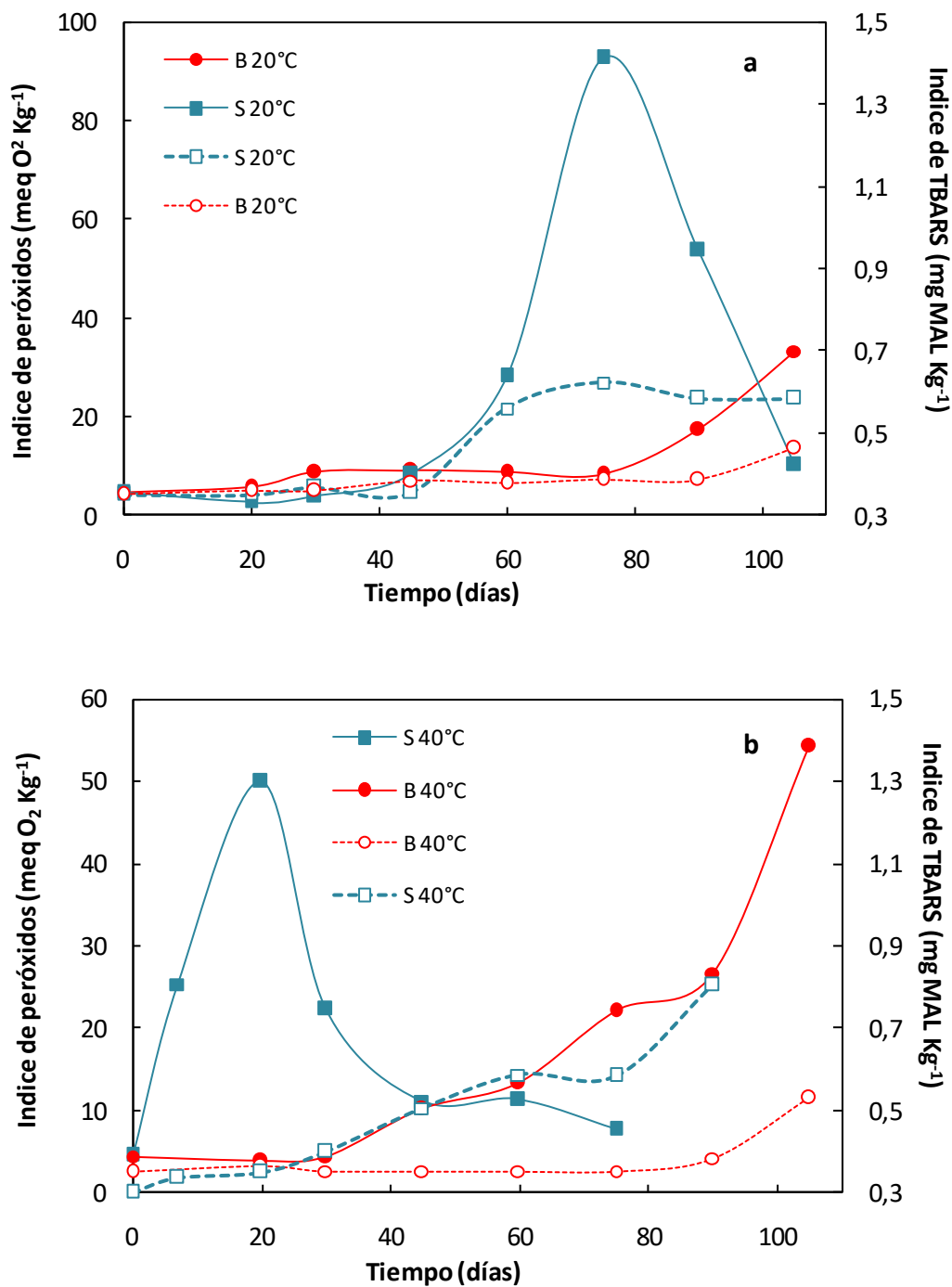


Figura 3.III.21. Evolución de la oxidación medida a través de Índice de peróxido (IP) e índice de TBARS para muestras de harina de nuez envasadas en material bicapa (B) y envase sintético control (S) y almacenadas a: **a)** 20°C y **b)** 40°C. Líneas llenas corresponden IP y líneas punteadas indican TBARS.

Los parámetros que definen la calidad de un producto indicaron que el envasado con la bicapa retrasó la autooxidación lipídica de las muestras almacenadas a 20°C debido a que los niveles de peróxidos se mantuvieron por debajo de los 10 meqO₂ kg⁻¹ de aceite, límite máximo establecido por la Legislación Nacional en materia de alimentos (Código Alimentario Argentino).

Según Schreiber (2012) a temperaturas bajas o moderadas y a presión atmosférica, la solubilidad del oxígeno es alta y los radicales alquilo lipídicos son las especies más comunes presentes. Una vez que el proceso de oxidación se inicia, la reacción con el oxígeno es muy rápida y los hidroperóxidos son los principales productos originados. A medida que aumenta la temperatura, la solubilidad del oxígeno disminuye drásticamente y la reacción de iniciación se vuelve más importante, aumentando la concentración de radicales alquilo. Por lo tanto, la tasa de descomposición de hidroperóxidos se vuelve más prominente. Estas explicaciones confirman la mayor velocidad de descomposición con formación de productos de oxidación secundaria en las muestras almacenadas a 40°C (Figura 3.III.21 b). A esta temperatura ambos envases tuvieron un comportamiento disímil y las muestras envasadas en el envase sintético control presentaron el máximo de IP a los 20 días mientras en el caso de las bicapas se produjo a los 60 días. En todos los casos los máximos de IP coincidieron con el aumento del índice de TBARS.

Como era predecible, la cinética de formación de productos de oxidación primaria (hidroperóxidos, peróxidos) y de descomposición con formación de productos de oxidación secundaria como aldehídos y cetonas fue más lenta en harina de nuez almacenada a 20°C (3.III.21 a y b).

En este punto vale la pena destacar que la baja permeabilidad al oxígeno de los materiales bicapa ($4,4 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) en comparación con el control de naturaleza sintética ($3,99 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) explicarían las diferencias observadas en los parámetros determinados. Estos índices (índice de peróxidos y TBARS) definen la aptitud de un producto para su consumo y dan idea de estado de oxidación de los lípidos presentes en la harina de

nuez. Por consiguiente, la capacidad barrera al O₂ de los materiales bicapa hizo posible retardar el deterioro de productos susceptibles de sufrir oxidación. Sumado a esto los materiales bicapa presentan una coloración oscura y exhiben capacidad de barrera al UV debido a la capa del nanocompuesto de quitosano funcionalizada con ácido gálico que preservan al producto de reacciones inducidas por la luz. Por todo lo expuesto los materiales desarrollados constituyen una barrera al O₂ efectiva en comparación con el material sintético.

Los resultados obtenidos están en sintonía con los informados por Ferreira y col. (2018) quienes realizaron experimentos en condiciones de deterioro acelerado (24 h de luz, 33% HR, 38°C durante 14 días) para muestras de aceite de nuez usando un material de envase bicapa a base de FucoPol/quitosano. Los autores asignaron un efecto protector al material de envase (bicapas deFucoPol/quitosano) frente a la oxidación.

En forma complementaria los estudios ATR-FTIR de las muestras de aceite provenientes de harinas envasadas y almacenadas revelaron cambios apenas perceptibles asociados al proceso de oxidación de lípidos (Figura 3.III.22).

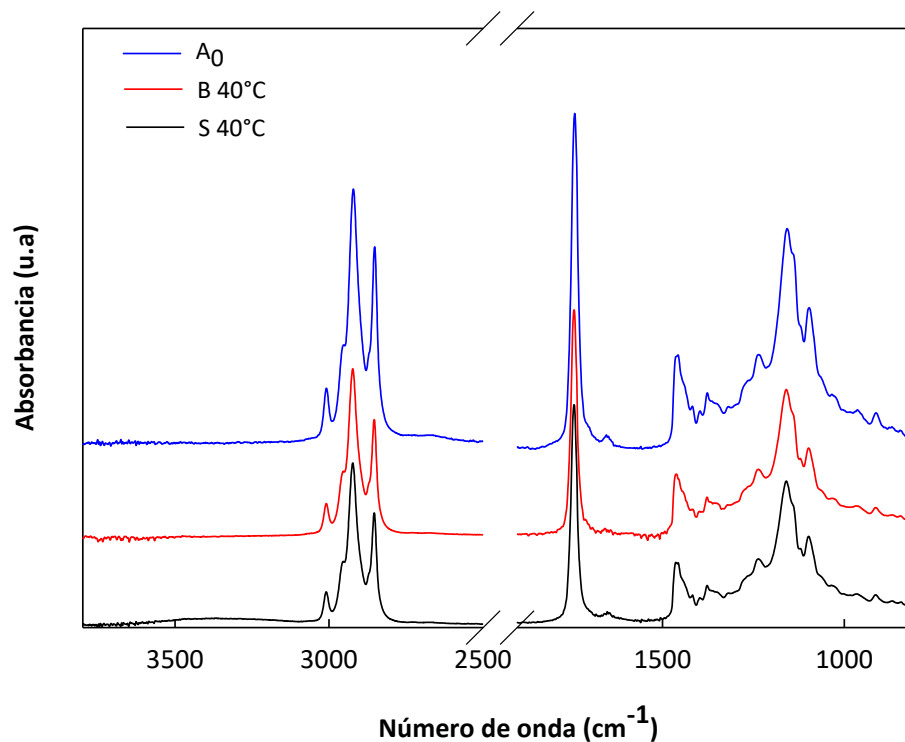


Figura 3.III.22. Espectro ATR-FTIR de muestras aceites extraídas de harina de nuez envasada con bicapa (B 40°C) y sintético (S 40°C) almacenadas durante 40 días a 40°C. A₀ corresponde al aceite de nuez recién extraído.

De acuerdo a Sullca (2017), uno de los principales cambios observados se identifica en la región $3600\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$. La banda localizada a 3390 cm^{-1} se ensanchó y se intensificó a medida que el grado de oxidación de las muestras aumentó debido a la formación de hidroperóxidos, generados durante la primera etapa del proceso de oxidación. Con el avance del proceso de oxidación, se produce la degradación de los hidroperóxidos, dando lugar a la formación de productos de oxidación secundaria.

El análisis mediante técnicas quimiométricas puso de manifiesto las diferencias observadas entre las muestras envasadas con la película bicapa y con el material sintético. A modo de ejemplo en la Figura 3.III.23 se presenta el análisis realizado sobre harina de nuez almacenada durante 20 y 40 días a 40°C.

Luego de 20 días de almacenamiento, la distribución sugiere dos grupos de muestras a lo largo de PC2: un grupo con puntaje PC2 negativo (B 20 y B 40°C) y otro con puntajes ubicados en el lado positivo de PC2 correspondiente a las muestras envasadas con el sintético almacenadas a 20°C y un tercer grupo intermedio entre ambos. Además, la distribución de muestras a lo largo de PC1 mostró que estos grupos exhibieron puntuación positiva excepto el grupo de muestras envasadas con el sintético y almacenadas a 40°C con puntuaciones negativas.

Transcurridos 40 días de almacenamiento se vislumbró una separación más marcada entre las muestras, pudiéndose inferir que el envasado de las muestras de harina con los distintos materiales de envase (bicapa y sintético) y el almacenamiento a distintas temperaturas produjo una separación en 4 grupos en la región de análisis $3600\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$. Estos hallazgos confirmaron la tendencia observada a partir de las determinaciones analíticas (índice de peróxidos y TBARS).

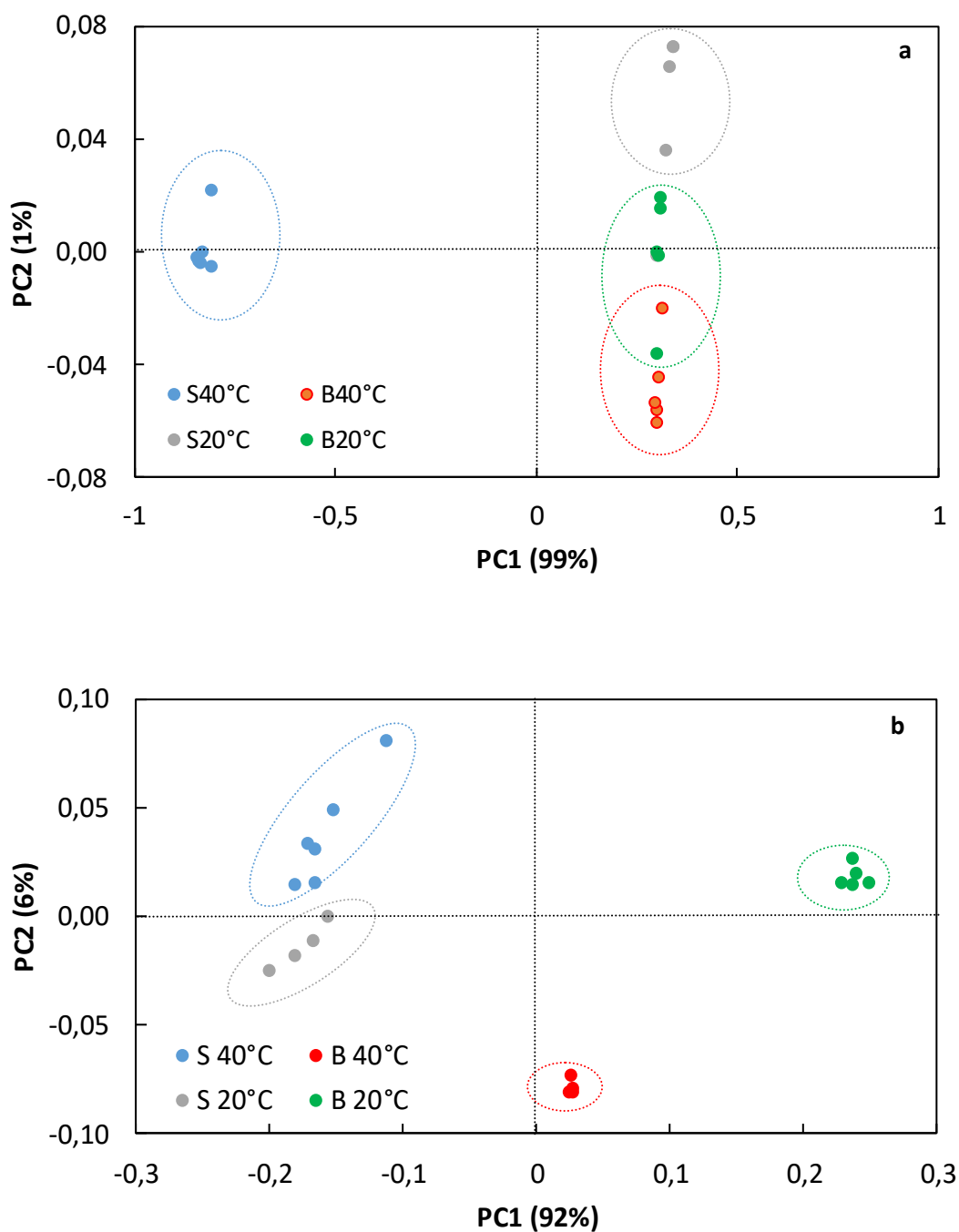


Figura 3.III.23 Gráfico biplot de las muestras de aceite extraídas de harina de nuez envasadas en material bicapa (B) y envase sintético control (S), almacenadas a 20°C y 40°C durante: **a)** 20 días; **b)** 40 días. Región espectral 3600-2600 cm^{-1} .

3.III.4. Conclusiones

Fue posible ensamblar materiales de diferente procedencia combinando las ventajas de cada matriz y obtener un sistema bicapa activo con propiedades de barrera al UV, al vapor de agua y al oxígeno adecuadas para envasar alimentos. Se diseñó un material factible de ser utilizado en el envasado de un alimento susceptible de sufrir oxidación como la harina de nuez. Los resultados en esa dirección demostraron que estos materiales retrasaron los procesos de autooxidación lipídica en comparación con el envase sintético.

Desde el punto de vista estructural, los estudios por MDSC, SEM, así como el análisis quimiométricos de PCA a partir de los espectros ATR-FTIR, expusieron la afinidad entre las capas ensambladas. No obstante, el carácter antimicrobiano de las bicapas no se vio alterado por el procesamiento por termocompresión.

Referencias

Abdelgawad, A. M., Hudson, S. M., y Rojas, O. J. (2014). Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydrate Polymers*, 100, 166-178.

Abdel-Rahman, R. M., Hrdina, R., Abdel-Mohsen, A. M., Fouda, M. M., Soliman, A. Y., Mohamed, F. K., Mohsin, K. y Pinto, T. D. (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107-120.

Abdelrazek, E. M., Elashmawi, I. S., y Labeeb, S. (2010). Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of PVA/PVP blend films. *Physica B: Condensed Matter*, 405(8), 2021-2027.

Ahmadi, E., Shabazi, B., y Fattahi, A. (2014). Sustained release of 5-fluorouracil from chitosan oligosaccharide-deesterified tragacanth core-shell nanoparticles. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 169-178.

Ahvenainen, R. (Ed.). (2003). *Novel Food Packaging Techniques*. Elsevier.

Aldunce, P. P. (1994). Effect of storage temperature on the quality of three cultivars of walnuts (Hartley, Serr, Vina).

Alves, A. D. C. S., Mainardes, R. M., y Khalil, N. M. (2016). Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 126-134.

Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., y Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer degradation and stability*, 95(11), 2126-2146.

Arrieta, M. P. (2014). Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación (Tesis Doctoral), Universidad Politécnica de Valencia.

Arrua, R. D., Moya, C., Bernardi, E., Zarzur, J., Strumia, M., y Igarzabal, C. I. A. (2010). Preparation of macroporous monoliths based on epoxy-bearing hydrophilic terpolymers and applied for affinity separations. *European Polymer Journal*, 46(4), 663-672.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 920.39 Lipids, Fats and Oils Analysis Total Fat Animal Feed en: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 1, Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA, 1990, pp.

Assis, R. Q., Lopes, S. M., Costa, T. M. H., Flôres, S. H., y de Oliveira Rios, A. (2017). Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. *Industrial Crops and Products*, 109, 818-827.

Augustin, M. A., y Hemar, Y. (2009). Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912.

Azizi, S., Ahmad, M. B., Hussein, M. Z., Ibrahim, N. A., y Namvar, F. (2014). Preparation and properties of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend bionanocomposites reinforced with cellulose nanocrystals/ZnO-Ag multifunctional nanosized filler. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1909-1917.

Balcerzak, J., y Mucha, M. (2010). Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 15, 117-125.

Barzoki, Z. M., Emam-Djomeh, Z., Mortazavian, E., Rafiee-Tehrani, N., Behmadi, H., Rafiee-Tehrani, M., y Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Determination of diffusion coefficient for released nanoparticles from developed gelatin/chitosan bilayered buccal films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 1005-1013.

Bastarrachea, L., Wong, D., Roman, M., Lin, Z., y Goddard, J. (2015). Active packaging coatings. *Coatings*, 5(4), 771-791.

Bhattacharya, M. (2016). Polymer nanocomposites—a comparison between carbon nanotubes, graphene, and clay as nanofillers. *Materials*, 9(4), 262.

Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., y Gopal, T. S. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6125-6135.

Biswas, S., Kar, S., Chaudhuri, S., y Nambissan, P. M. G. (2006). Positron annihilation studies of defects and interfaces in ZnS nanostructures of different crystalline and morphological features. *The Journal of Chemical Physics*, 125(16), 164719.

Bonilla, J., Fortunati, E. L. E. N. A., Vargas, M., Chiralt, A., y Kenny, J. M. (2013). Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 236-243.

Bonilla, J., Fortunati, E.L.E.N., Atarés, L., Chiralt, A., y Kenny, J.M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463-470.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., y Simoes, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256-265.

Božič, M., Gorgieva, S., y Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2388-2398.

Brum, A. A. S., dos Santos, P. P., da Silva, M. M., Paese, K., Guterres, S. S., Costa, T. M. H., Pohlmann A.F., Jablonski A., Hickmann Flôres S., y de Oliveira Rios, A. (2017). Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 522, 477-484.

Cao, N., Fu, Y., y He, J. (2007). Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 575-584.

Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., y Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648-653.

Chen, Y., Cao, X., Chang, P. R., y Huneault, M. A. (2008). Comparative study on the films of poly (vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly (vinyl alcohol)/native pea starch. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 8-17.

Chen, X., Chen, M., Xu, C., y Yam, K. L. (2018). Critical review of controlled release packaging to improve food safety and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14.

Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S., y Solaro, R. (2003). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer science*, 28(6), 963-1014.

Clavijo, C. (2004): Extracción de Aceite de Semilla de Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) por prensado en frío, caracterización química del aceite y mejoramiento del proceso mediante tratamiento enzimático de la semilla previo al prensado. Tesis Magíster en Ciencias de los Alimentos. Santiago. Universidad de Chile.

Coles, R., McDowell, D., y Kirwan, M. J. (Eds.). (2003). *Food packaging technology* (Vol. 5). CRC Press.

Corsello, F. A., Bolla, P. A., Anbinder, P. S., Serradell, M. A., Amalvy, J. I., y Peruzzo, P. J. (2017). Morphology and properties of neutralized chitosan-cellulose nanocrystals biocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 156, 452-459.

da Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R. C., Nunes, M. R., Benvenutti, E. V., da Luz, S. R., y Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138-146.

de Moura, M. R., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., y Mattoso, L. H. C. (2008). Properties of novel hydroxypropyl methylcellulose films containing chitosan nanoparticles. *Journal of food science*, 73(7), N31-N37.

de Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., y Mattoso, L. H. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 448-453.

Del Nobile, M.A. (2001). Packaging design for potato chips. *Journal of Food Engineering*, 47(3), 211-215.

Di Giorgio, L., Salgado, P.R., y Mauri, A.N. (2019). Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocolloids*, 87, 891-901.

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., y Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., y Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647.

Fan, J., Zhou, W., Wang, Q., Chu, Z., Yang, L., Yang, L., Sun J., Zhao L., Xu J., Liang Y., y Chen, Z. (2018). Structure dependence of water vapor permeation in polymer nanocomposite membranes investigated by positron annihilation lifetime spectroscopy. *Journal of Membrane Science*, 549, 581-587.

Feldman, E. B. (2002). The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *The Journal of Nutrition*, 132(5), 1062S-1101S.

Fennema, O. R. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. CRC Press.

Fernández Cañete, A. (2013). Estudio de la hidrofobicidad y autolimpieza en materiales con nano tratamientos superficiales. Universidad Autónoma de Barcelona. Ingeniería de Materiales Proyecto Final de Carrera Ingeniería de Materiales.

Ferreira, A.R., Torres, C.A., Freitas, F., Sevrin, C., Grandfils, C., Reis, M.A., Vitor, D., Alves y Coelho, I.M. (2016). Development and characterization of bilayer films of FucoPol and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 147, 8-15.

Ferreira, A. R. V., Bandarra, N. M., Moldão-Martins, M., Coelho, I. M., y Alves, V. D. (2018). FucoPol and chitosan bilayer films for walnut kernels and oil preservation. *LWT*, 91, 34-39.

Ghozali, M., y Haryono, A. (2013). Effect of size of cellulose particle as filler in the PVC biocomposites on their thermal and mechanical properties. In *Materials Science Forum* (Vol. 737, pp. 67-73). Trans Tech Publications.

Gierszewska-Drużyńska, M., y Ostrowska-Czubenko, J. (2010). The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, Polish Chitin Society, Łódź, 25-32.

Gómez-Estaca, J., Lopez-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., y Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.

Gorrasi, G., Vittoria, V., Murariu, M., Ferreira, A. D. S., Alexandre, M., y Dubois, P. (2008). Effect of filler content and size on transport properties of water vapor in PLA/calcium sulfate composites. *Biomacromolecules*, 9(3), 984-990.

Gou, J., Liang, Y., Miao, L., Chao, Y., Zhang, Y., Yin, T., He H. y Tang, X. (2018). The promoting effect of enteric materials on the oral absorption of larotaxel-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 124, 288-294.

Goworek, T. (2002). Comments on the relation: positronium lifetime–free volume size parameters of the Tao–Eldrup model. *Chemical Physics Letters*, 366(1-2), 184-187.

Gu, J. E., Lee, S., Stafford, C. M., Lee, J. S., Choi, W., Kim, B. Y., Baek, K., Y., Chan, E., P., Chung, J., Y., Bang, J., y Lee, J. H. (2013). Molecular layer-by-layer assembled thin-film composite membranes for water desalination. *Advanced Materials*, 25(34), 4778-4782.

Guiotto, E.N. (2014). Aplicación de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) y girasol (*Helianthus annus* L.) en alimentos. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).

Gutiérrez-Pineda, E., Cáceres-Vélez, P. R., Rodríguez-Presa, M. J., Moya, S. E., Gervasi, C. A., y Amalvy, J. I. (2018). Hybrid conducting composite films based on polypyrrole and poly (2-(diethylamino) ethyl methacrylate) hydrogel nanoparticles for electrochemically controlled drug delivery. *Advanced Materials Interfaces*, 1800968.

Hari, N., Francis, S., Nair, A. G. R., y Nair, A. J. (2018). Synthesis, characterization and biological evaluation of chitosan film incorporated with β -Carotene loaded starch nanocrystals. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 69-76.

Hasheminejad, N., Khodaiyan, F., y Safari, M. (2019). Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, 275, 113-122.

Hay, J.M., y Lyon, D. (1967). Vinyl Alcohol: a Stable Gas Phase Species?. *Nature*, 216(5117), 790. He, L. H., Xue, R., Yang, D. B., Liu, Y., y Song, R. (2009). Effects of blending chitosan with PEG on surface morphology, crystallization and thermal properties. *Chinese Journal of Polymer Science*, 27(04), 501-510.

He, L. H., Xue, R., Yang, D. B., Liu, Y., & Song, R. (2009). Effects of blending chitosan with PEG on surface morphology, crystallization and thermal properties. *Chinese Journal of Polymer Science*, 27(04), 501-510.

Hernandez, R. J., Selke, S. E., y Culter, J. D. (2000). *Plastics packaging: properties, processing, applications, and regulations*. Hanser.

Hernández-Lauzardo, A., Bautista-Banos, S., Velazquez-Del Valle, M., Mendez-Montevalvo, M., Sanchez-Rivera, M., y Bello-Perez, L. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopusstolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*. 73, 541-547.

Homez-Jara, A., Daza, L. D., Aguirre, D. M., Muñoz, J. A., Solanilla, J. F., y Váquiro, H. A. (2018). Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233-1240.

Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., y Farahmandghavi, F. (2015). Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 172-182.

Hsieh, T. T., Tiu, C., y Simon, G. P. (2001). Correlation between molecular structure, free volume, and physical properties of a wide range of main chain thermotropic liquid crystalline polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(9), 2252-2267.

Hu, B., Wang, Y., Xie, M., Hu, G., Ma, F., Zeng, X. (2015). Polymer nanoparticles composed with gallic acid grafted chitosan and bioactive peptides combined antioxidant, anticancer activities and improved delivery property for labile polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 15, 593–603.

Huang, K. S., Grumezescu, A. M., Chang, C. Y., Yang, C. H., y Wang, C. Y. (2014). Immobilization and stabilization of TiO₂ nanoparticles in alkaline-solidificated chitosan spheres without cross-linking agent. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 3(2), 174-178.

Imran, M., Revol-Junelles, A. M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., y Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-

emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407-419.

Jensen, P. N., Sørensen, G., Brockhoff, P., y Bertelsen, G. (2003). Investigation of packaging systems for shelled walnuts based on oxygen absorbers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4941-4947.

Jiang S., Liu S., y Feng W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4, 1228–1233.

Jose, G., Lu, Y. J., Chen, H. A., Hsu, H. L., Hung, J. T., Anilkumar, T. S., y Chen, J. P. (2018). Hyaluronic acid modified bubble-generating magnetic liposomes for targeted delivery of doxorubicin. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 474, 355-364.

Kalwar, K., Sun, W. X., Li, D. L., Zhang, X. J., y Shan, D. (2016). Coaxial electrospinning of polycaprolactone@ chitosan: Characterization and silver nanoparticles incorporation for antibacterial activity. *Reactive and Functional Polymers*, 107, 87-92.

Karbowiak, T., Mansfield, A. K., Barrera-García, V. D., y Chassagne, D. (2010). Sorption and diffusion properties of volatile phenols into cork. *Food Chemistry*, 122(4), 1089-1094.

Kang, H. J., Kim, S. J., You, Y. S., Lacroix, M., y Han, J. (2013). Inhibitory effect of soy protein coating formulations on walnut (*Juglans regia* L.) kernels against lipid oxidation. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 393-396.

Kaur, M., Kalia, A., y Thakur, A. (2017). Effect of biodegradable chitosan–rice-starch nanocomposite films on post-harvest quality of stored peach fruit. *Starch-Stärke*, 69(1-2), 1600208.

Kaviyarasu, K., Premanand, D., Kennedy, J., y Manikandan, E. (2013). Synthesis of Mg doped TiO₂ nanocrystals prepared by wet-chemical method: optical and microscopic studies. *International Journal of Nanoscience*, 12(05), 1350033.

Kaviyarasu, K., Manikandan, E., Kennedy, J., y Maaza, M. (2015). A comparative study on the morphological features of highly ordered MgO: AgOnanocube arrays prepared via a hydrothermal method. *RSC Advances*, 5(100), 82421-82428.

Khan, M. I. H., Islam, J. M., Kabir, W., Rahman, A., Mizan, M., Rahman, M. F., .Amin, J. y Khan, M. A. (2016). Development of hydrocolloid bi-layer dressing with bio-adhesive and non-adhesive properties. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 609-615.

Koegler, W. S., y Griffith, L. G. (2004). Osteoblast response to PLGA tissue engineering scaffolds with PEO modified surface chemistries and demonstration of patterned cell response. *Biomaterials*, 25(14), 2819-2830.

Kotakowska, A., y Sikorski, Z. E. (Eds.). (2003). *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*.

Korsmeyer R.W., y Peppas N.A. (1981). Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science*, 9(3), 211-227.

Kubo, S., y Kadla, J. F. (2003). The formation of strong intermolecular interactions in immiscible blends of poly (vinyl alcohol)(PVA) and lignin. *Biomacromolecules*, 4(3), 561-567.

Kumar, H.N., Prabhakar, M.N., Prasad, C.V., Rao, K.M., Reddy, T.A.K., Rao, K.C., y Subha, M.C.S. (2010). Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30 C. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 251-255.

Kurek, M., Galus, S., y Debeaufort, F. (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 56-67.

LaCoste, A., Schaich, K. M., Zumbunnen, D., y Yam, K. L. (2005). Advancing controlled release packaging through smart blending. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 18(2), 77-87.

Lagaron, J. M., Cabedo, L., Cava, D., Feijoo, J. L., Gavara, R., & Gimenez, E. (2005). Improving packaged food quality and safety. Part 2: Nanocomposites. *Food Additives and Contaminants*, 22(10), 994-998.

Lamarra, J., Rivero, S., y Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 717-726.

Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 848-859.

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., y Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 661(2), 23-67.

Latou, E., Mexis, S. F., Badeka, A. V., Kontakos, S., y Kontominas, M. G. (2014). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 263-268.

Lee, S. W., Lee, S. K., y Belcher, A. M. (2003). Virus-based alignment of inorganic, organic, and biological nanosized materials. *Advanced Materials*, 15(9), 689-692.

Lee, C. H., An, D. S., Park, H. J., y Lee, D. S. (2003). Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Packaging Technology and Science*, 16, 99-106.

Lee, C. H., An, D. S., Lee, S. C., Park, J. J., y Lee, D. S. (2004). A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *Journal of Food Engineering*, 62, 323-329.

Lee, J. W., Son, S. M., y Hong, S. I. (2008). Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 484-493.

Lee, D. S., Yam, K. L., and Piergiovanni, L. (2008). Migration and food packaging interactions. In: Food Packaging Science and Technology, pp. 109-138. Lee, D. S., Yam, K. L., and Piergiovanni, L. (Eds.), CRC Press.

Lemes, B. M., Novatski, A., Ferrari, P. C., Minozzo, B. R., Justo, A. D. S., Petry, V. E., Velloso J.C.R., Sabino S.R.F., Gunha J.V., Esmerino L.A., y Beltrame, F. L. (2018). Physicochemical, biological and release studies of chitosan membranes incorporated with Euphorbia umbellata fraction. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28 (4), 433-443.

Liu, F., Antoniou, J., Li, Y., Yi, J., Yokoyama, W., Ma, J., y Zhong, F. (2015). Preparation of gelatin films incorporated with tea polyphenol nanoparticles for enhancing controlled-release antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3987-3995.

Liu, S., y Ho, P. C. (2017). Formulation optimization of scutellarin-loaded HP- β -CD/chitosan nanoparticles using response surface methodology with Box–Behnken design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(4), 378-385.

Liu, Y., Yu, S., Wu, H., Li, Y., Wang, S., Tian, Z., y Jiang, Z. (2014). High permeability hydrogel membranes of chitosan/poly ether-block-amide blends for CO₂ separation. *Journal of Membrane Science*, 469, 198-208.

López, O. V., Giannuzzi, L., Zaritzky, N. E., y García, M. A. (2013). Potassium sorbate controlled release from corn starch films. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1583-1591.

López-Rubio, A., y Lagaron, J. M. (2011). Improved incorporation and stabilisation of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. *Food Chemistry*, 125(3), 997-1004.

Macchi, C. (2013). Caracterización de nanoestructuras sub-superficiales utilizando espectroscopía de aniquilación de positrones. *Matéria*, 18(4), 1425-1435.

Mali, S., Grossmann, M., García, M., Martino, M., y Zaritzky, N. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 379-386.

Marchetti, L., Romero, L. M., Andres, S. C., y Califano, A. N. (2017). Characterization of pecan nut expeller cake and effect of storage on its microbiological and oxidative quality. *Grasas y Aceites*. DOI: [10.3989/gya.0667171](https://doi.org/10.3989/gya.0667171)

Mardila, V. T., Wulandari, I. O., Shobirin, R. A., Santjojo, D. J., y Sabarudin, A. (2016). In-situ synthesis and characterization of chitosan-Fe₃O₄ nanoparticles using tripolyphosphate/citrate as cross-linker. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 17(3), 249.

Marmur, A. (2006). Soft contact: measurement and interpretation of contact angles. *Soft Matter*, 2(1), 12-17.

Márquez-Ruiz, G. (2008). Oxidação Lipídica em Alimentos: Avaliação Analítica e Nutricional. Estratégias para sua Prevenção. En: III Simpósio Internacional: Tendencias e Innovaciones en Tecnología de Aceites y Grasas, Campinas, Sao Paulo (Brasil)

Martin, O., Schwach, E., Averous, L., y Couturier, Y. (2001). Properties of biodegradable multilayer films based on plasticized wheat starch. *Starch-Stärke*, 53(8), 372-380.

Martins, J.T., Cerqueira, M.A., y Vicente, A.A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220-227.

Martins, C., Vilarinho, F., Silva, A.S., Andrade, M., Machado, A.V., Castilho, M.C., Sá, A., Cunhae, A., Vaz, M.F., Ramos, F. (2018). Active polylactic acid film incorporated with green tea extract: Development, characterization and effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 123, 100-110.

Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., y Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591-598.

- Mexis, S. F., Badeka, A. V., Riganakos, K. A., Karakostas, K. X., y Kontominas, M. G. (2009). Effect of packaging and storage conditions on quality of shelled walnuts. *Food Control*, 20(8), 743-751.
- Mi, F.L., Shyu, S.S., Lee, S.T., y Wong, T.B. (1999). Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 37(14), 1551-1564.
- Minfeng, Z., Xudong, S., Yun, W., Xiandong, Y., Huiquan, X., Baoyi, W., y Chenze, Q. (2008). Correlations between the free-volume properties and the miscibility of chitosan/polar polymers blend membranes. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(9), 1062-1068.
- Moudache, M., Colon, M., Nerín, C., y Zaidi, F. (2016). Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chemistry*, 212, 521-527.
- Moudache, M., Nerín, C., Colon, M., y Zaidi, F. (2017). Antioxidant effect of an innovative active plastic film containing olive leaves extract on fresh pork meat and its evaluation by Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 229, 98-103.
- Muller, J., Quesada, A. C., González-Martínez, C., y Chiralt, A. (2017). Antimicrobial properties and release of cinnamaldehyde in bilayer films based on polylactic acid (PLA) and starch. *European Polymer Journal*, 96, 316-325.
- Muniz, F. T. L., Miranda, M. A. R., Morilla dos Santos, C., y Sasaki, J. M. (2016). The Scherrer equation and the dynamical theory of X-ray diffraction. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, 72(3), 385-390.
- Munshi, A. M., Singh, V. N., Kumar, M., y Singh, J. P. (2008). Effect of nanoparticle size on sessile droplet contact angle. *Journal of Applied Physics*, 103(8), 084315.

Muramatsu, H., Matsumoto, K., Minekawa, S., Yagi, Y., y Sasai, S. (2001). Ortho-positronium annihilation parameters in polyvinyl alcohol films with various degrees of polymerization, saponification and crystallinity. *Radiochimica Acta*, 89(2), 119-123.

Naduparambath, S., Sreejith, M.P., Jinitha, T.V., Shaniba, V., Aparna, K.B., y Purushothaman, E. (2018) Development of green composites of poly (vinyl alcohol) reinforced with microcrystalline cellulose derived from sago seed shells. *Polymer Composites*.

Nagpal, K., Singh, S. K., y Mishra, D. N. (2012). Nanoparticle mediated brain targeted delivery of gallic acid: in vivo behavioral and biochemical studies for improved antioxidant and antidepressant-like activity. *Drug Delivery*, 19(8), 378-391.

Nerín, C. (2010). Antioxidant active food packaging and antioxidant edible films. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Volume 2: Management in Different Industry Sectors, 496-515.

Noronha, C.M., De Carvalho, S.M., Lino, R.C., y Barreto, P.L.M. (2014). Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*, 159, 529–535.

Ochoa-Yepes, O., Di Goglio, L., Goyanes, S., Mauri, A., y Famá, L. (2019). Influence of process (extrusion/thermo-compression, casting) and lentil protein content on physicochemical properties of starch films. *Carbohydrate polymers*, 208, 221-231.

Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., y Rigal, L. (2002). Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43(20), 5417-5425.

Ortega-Toro, R., Morey, I., Talens, P., y Chiralt, A. (2015). Active bilayer films of thermoplastic starch and polycaprolactone obtained by compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 127, 282-290.

Othman, N., Masarudin, M., Kuen, C., Dasuan, N., y Abdullah, L. (2018). Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles loaded with L-ascorbic acid and thymoquinone. *Nanomaterials*, 8(11), 920.

Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C., y Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 205-210.

Pacheco, N., Naal-Ek, M. G., Ayora-Talavera, T., Shirai, K., Román-Guerrero, A., Fabela-Morón, M. F., y Cuevas-Bernardino, J. C. (2019). Effect of bio-chemical chitosan and gallic acid into rheology and physicochemical properties of ternary edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 149-158.

Pagno, C.H., de Farias, Y.B., Costa, T.M.H., Rios, A., de, O., y Flores, S.H. (2016). Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules. *J. Food Sci. Technol.* 53, 3197–3205 –762.

Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Cady, N. C., Bergkvist, M., y Niamsiri, N. (2018). Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant. *Food Control*, 86, 294-301.

Parize, A. L., Stulzer, H. K., Laranjeira, M. C. M., Brighente, I. M. D. C., y Souza, T. C. R. D. (2012). Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. *Química Nova*, 35(6), 1127-1132.

Peng, H. G., Vallery, R. S., Liu, M., Skalsey, M., y Gidley, D. W. (2007). Depth-profiled positronium annihilation lifetime spectroscopy on porous films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 300(1-2), 154-161.

Peponi, L., Tercjak, A., Torre, L., Mondragon, I., y Kenny, J. M. (2009). Nanostructured physical gel of SBS block copolymer and Ag/DT/SBS nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 44(5), 1287.

Peppas N.A. (1985). Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4), 110-111.

Pereda, M., Ponce, A.G., Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., y Martucci, J.F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1372-1381.

Pezo, D., Salafranca, J., y Nerín, C. (2008). Determination of the antioxidant capacity of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1178(1-2), 126-133.

Piron, E., Accominotti, M., y Domard, A. (1997). Interaction between chitosan and uranyl ions. Role of physical and physicochemical parameters on the kinetics of sorption. *Langmuir*, 13(6), 1653-1658.

Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Turcuş, V., Predoi, G., y Iordache, F. (2018). Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Qiao, R., y Brinson, L. C. (2009). Simulation of interphase percolation and gradients in polymer nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 69(3-4), 491-499.

Rabea, E.I., Badawy, M.E., Stevens, C.V., Smagghe, G., y Steurbaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.

Ramon, O., Kesselman, E., Berkovici, R., Cohen, Y., y Paz, Y. (2001). Attenuated total reflectance/fourier transform infrared studies on the phase-separation process of aqueous solutions of poly (n-isopropylacrylamide). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 39(14), 1665-1677.

Ramos, Ó. L., Santos, A. C., Leão, M. V., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco M.I., Pintado M.E., y Malcata, F. X. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared

from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*, 25(2), 132-141.

Ray, S. S., y Bousmina, M. (2005). Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st century materials world. *Progress in Materials Science*, 50(8), 962-1079.

Reis, L.C.B., De Souza, C.O., Da Silva, J.B.A., Martins, A.C., Nunes, I.L., y Druzian, J.I. (2015). Active biocomposites of cassava starch: the effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 382–391.

Rhim, J.W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 323-330.

Rhim, J. W., Lee, J. H., y Ng, P. K. (2007). Mechanical and barrier properties of biodegradable soy protein isolate-based films coated with polylactic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 232-238.

Rhim, J. W. (2013). Effect of PLA lamination on performance characteristics of agar/k-carrageenan/clay bio-nanocomposite film. *Food Research International*, 51(2), 714-722.

Ritthidej, G.C., Phaechamud, T., y Koizumi, T. (2002). Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, 232(1-2), 11-22.

Rivero, S., García, M. A., y Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 531-539.

Rivero, S., Garcia M.A. y Pinotti, A. (2010). Cross linking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82, 270-276.

Rivero, S. G., Garcia, M. A., & Pinotti, A. N. (2013). Physical and chemical treatments on chitosan matrix to modify film properties and kinetics of biodegradation. *Journal of Materials Physics Chemistry* 1 (3) (2013) 51–57.

Rivero, S. G., Garcia, M. A., y Pinotti, A. N. (2014). Microstructural characterization of chitosan films used as support for ferulic acid release. *Advance Materials Letters*, 4(10), 578-586

Rivero, S., Damonte, L., García, M. A., y Pinotti, A. (2016). An insight into the role of glycerol in chitosan films. *Food Biophysics*, 11(2), 117-127.

Rivero, S., Lecot, J., y Pinotti, A. (2017). Impregnation of kraft paper support with polylactic acid multilayers. *Advanced Materials Letters*, 8(6), 741-751.

Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J., y Santos, J. (2012). Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*, 134(1), 1-8.

Romainor, A. N. B., Chin, S. F., Pang, S. C., y Bilung, L. M. (2014). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles-doped cellulose films with antimicrobial property. *Journal of Nanomaterials*, 130. DOI:10.1155/2014/710459.

Romano, N., Araujo-Andrade, C., Lecot, J., Mobili, P., y Gómez-Zavaglia, A. (2018). Infrared spectroscopy as an alternative methodology to evaluate the effect of structural features on the physical-chemical properties of inulins, *Food Research International*, 109, 223–231.

Rubentheren, V., Ward, T. A., Chee, C. Y., y Tang, C. K. (2015). Processing and analysis of chitosan nanocomposites reinforced with chitin whiskers and tannic acid as a crosslinker. *Carbohydrate Polymers*, 115, 379-387.

Ruiz-Cabello, F.J.M. (2009). Efecto de la rugosidad y heterogeneidad superficial en fenómenos de mojado. Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada.

Sahmani, S., Saber-Samandari, S., Shahali, M., Yekta, H. J., Aghadavoudi, F., Montazeran, A. H., Aghdam M.M. y Khandan, A. (2018). Mechanical and biological performance of axially loaded novel bio-nanocomposite sandwich plate-type implant coated by biological polymer thin film. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 88, 238-250.

Santana, M.C.C.B., Machado, B. a. S., Silva, T.N., Nunes, I.L., y Druzian, J.I. (2013). Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. *Ciência Rural* 43, 544–550.

Sanuja, S., Agalya, A., y Umapathy, M. J. (2015). Synthesis and characterization of zinc oxide–neem oil– chitosan bionanocomposite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 76-84.

Schreiber, S. B. (2012). Chitosan-gallic acid films as multifunctional food packaging.

Shariatnia, Z., y Fazli, M. (2015). Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. *Food Hydrocolloids*, 46, 112-124.

Sharma, S. K., Sudarshan, K., Sahu, M., y Pujari, P. K. (2016). Investigation of free volume characteristics of the interfacial layer in poly (methyl methacrylate)–alumina nanocomposite and its role in thermal behaviour. *RSC Advances*, 6(72), 67997-68004.

Shavi, G. V., Nayak, U. Y., Reddy, M. S., Karthik, A., Deshpande, P. B., Kumar, A. R., y Udupa, N. (2011). Sustained release optimized formulation of anastrozole-loaded chitosan microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(4), 865-878.

Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), 4353-4364.

Shtay, R., Keppler, J. K., Schrader, K., y Schwarz, K. (2019). Encapsulation of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in solid lipid nanoparticles for food applications. *Journal of Food Engineering*, 244, 91-100.

Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P.J.A., y Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 458-466.

Siracusa, V., Blanco, I., Romani, S., Tylewicz, U., Rocculi, P., y Rosa, M. D. (2012). Poly (lactic acid)-modified films for food packaging application: Physical, mechanical, and barrier behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(S2). DOI 10.1002/app.36829

Siripatrawan, U., y Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.

Siró, I., Fenyvesi, É., Sente, L., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., Orgoványi, J., y Barta, J. (2006). Release of alpha-tocopherol from antioxidative low-density polyethylene film into fatty food simulant: influence of complexation in beta-cyclodextrin. *Food Additives and Contaminants*, 23(8), 845-853.

Sivaselvi, K., y Ghosh, P. (2017). Characterization of modified chitosan thin film. *Materials Today: Proceedings*, 4(2), 442-451.

Souza, C. O., Silva, L. T., Silva, J. R., López, J. A., Veiga-Santos, P., y Druzian, J. I. (2011). Mango and acerola pulps as antioxidant additives in cassava starch bio-based film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2248-2254.

Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A., y Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 107, 565-572.

Sujima-Anbu A., Sahi S.V, y Venkatachalam P. (2016)., Synthesis of bioactive chemicals crosslinked sodium tripolyphosphate (TPP)-chitosan nanoparticles for enhanced cytotoxic activity against human ovarian cancer cell line (PA-1). *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 7, 1-9,

Sugita, P., Ambarsari, L., Sari, Y. A., y Nugraha, Y. (2013). Ketoprofen encapsulation optimization with chitosan-alginate cross-linked with sodium tripolyphosphate and its realease mechanism determination using in vitro dissolution. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 14(1), 141-9.

Sumit, G. (2012). Nanotechnology in food packaging a critical review. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 10(10)

Sun, Y., Liu, Y., Li, Y., Lv, M., Li, P., Xu, H., y Wang, L. (2011). Preparation and characterization of novel curdlan/chitosan blending membranes for antibacterial applications. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 952-959.

Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H., y Zhou, K. (2014). The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan–gallic acid films. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 83-89.

Tavera-Quiroz, M. J., Urriza, M., Pinotti, A., y Bertola, N. (2015). Baked snack from green apples formulated with the addition of isomalt. *LWT-Food Science and Technology*, 62(2), 1004-1010.

Teodoro, A. P., Mali, S., Romero, N., y de Carvalho, G. M. (2015). Cassava starch films containing acetylated starch nanoparticles as reinforcement: Physical and mechanical characterization. *Carbohydrate Polymers*, 126, 9-16.

Tjong, S.C. (2006). Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 53(3-4), 73-197.

Tironi, V. A. (2005). Rancidez oxidativa en salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*). Interacción lípidos oxidados – proteínas. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).

Urreaga, J.M., y De la Orden, M.U. (2007). Modification of cellulose with amino compounds: A fluorescence study. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 14-19.

Valencia, G.A. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: Una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria*, 2.

Valencia-Sullca, C., Vargas, M., Atarés, L., y Chiralt, A. (2018). Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 75, 107-115.

Valente, J.F.A., Gaspar, V.M., Antunes, B.P., Countinho, P., y Correia, I.J. (2013). Microencapsulated chitosan–dextran sulfate nanoparticles for controlled delivery of bioactive molecules and cells in bone regeneration. *Polymer*, 54(1), 5-15.

van den Broek, L. A., Knoop, R. J., Kappen, F. H., y Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 116, 237-242.

Vanhanen, L. P., y Savage, G. P. (2006). The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging. *Food Chemistry*, 99(1), 64-69.

Vasconcellos, F. C., Bataglioli, R. A., Flores, E. B., y Beppu, M. M. (2012). Thermal treatment effects on biopolymer multilayered thin films. In *Advanced Materials Research* (Vol. 409, pp. 181-186). Trans Tech Publications.

Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 545-554.

Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., y Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 35-41.

Weiss, J., Takhistov, P., y McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), R107-R116.

Wen, X., y Tresco, P. A. (2006). Fabrication and characterization of permeable degradable poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels. *Biomaterials*, 27(20), 3800-3809.

Wrona, M., Cran, M. J., Nerín, C., y Bigger, S. W. (2017). Development and characterisation of HPMC films containing PLA nanoparticles loaded with green tea extract for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 156, 108-117.

Wrona, M., Vera, P., Pezo, D., y Nerín, C. (2017). Identification and quantification of odours from oxobiodegradable polyethylene oxidised under a free radical flow by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry. *Talanta*, 172, 37-44.

Xia, R., Cao, X., Gao, M., Zhang, P., Zeng, M., Wang, B., y Wei, L. (2017). Probing sub-nano level molecular packing and correlated positron annihilation characteristics of ionic cross-linked chitosan membranes using positron annihilation spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(5), 3616-3626.

Yang, S., Lei, P., Shan, Y., y Zhang, D. (2018). Preparation and characterization of antibacterial electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide composite nanofibrous membrane. *Applied Surface Science*, 435, 832-840

Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., y Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 292-297.

Young, T. (1805). III. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical transactions of the royal society of London*, (95), 65-87.

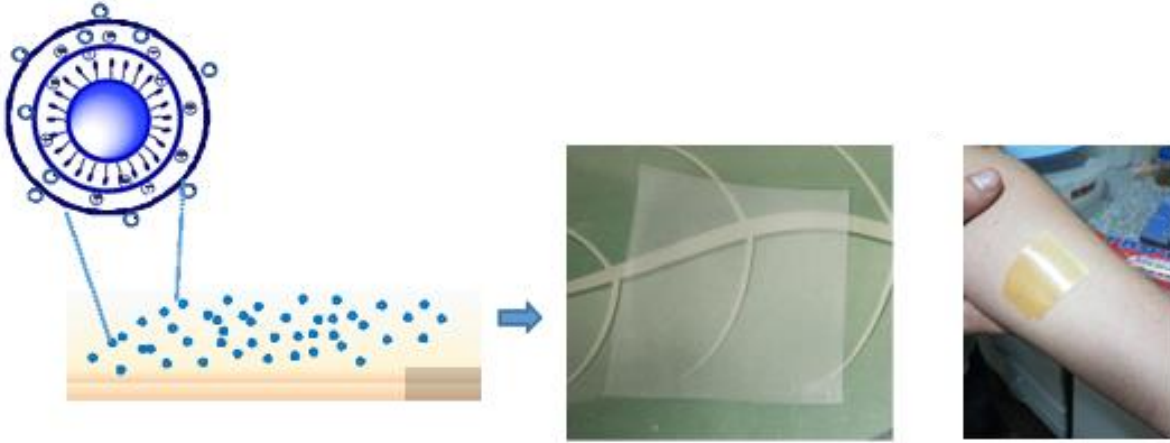
Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., y Singh, P. (2016). Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2223-2230.

Zhang, Y., y Han, J. H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71(6), E253-E261.

Zhang, L., Zhang, G., Lu, J., y Liang, H. (2013). Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blend film as a potential coating material. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 52(2), 163-167.

Zhang, X., Liu, J., Qian, C., Kan, J., y Jin, C. (2019). Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food Hydrocolloids*, 89, 1-10.

Capítulo 4



Capítulo 4

4.1. Introducción

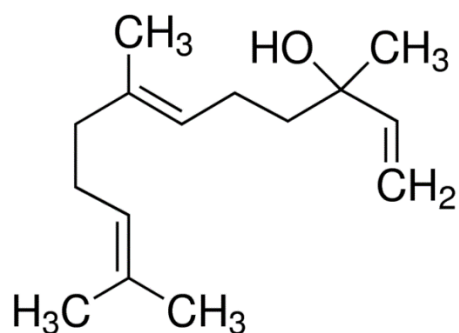
4.1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos volátiles aislados a través de métodos físicos de plantas de origen taxonómico conocido. Son compuestos líquidos y aromáticos a temperatura ambiente, de naturaleza oleosa y volátil, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Estos compuestos son producto de las rutas biosintéticas del mevalonato para producir diferentes terpenos, principalmente mono y sesquiterpenos. Son obtenidos a partir de plantas y especias, las cuales en su mayoría contienen compuestos de estructuras terpénicas y fenilpropánicas, almacenadas en los tejidos secretores de vegetales aromáticos. La planta puede sintetizar estas sustancias de manera interna (secreción interna) o externa (secreción externa); pudiendo localizarlas en las flores, en las hojas, en la raíz, en todo el árbol, en las cáscaras de los frutos, y en las resinas que exuden. Muchas de estos compuestos volátiles tienen funciones diversas, entre las que se destaca la función de defensa de las plantas (Harrewijn y col., 2001). Entre la diversa variedad de aceites esenciales presentes se encuentra el cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*), el cual es obtenido a través de un proceso de destilación por arrastre con vapor de agua sobre la madera de cabreuva. *Myrocarpus fastigiatus* es una especie arbórea, endémica de la región de las Yungas en el noroeste argentino, Bolivia, Paraguay, Colombia, Perú y Brasil (Martinetz y col., 1998). Este aceite ha sido utilizado por los indios nativos de América y México para tratar diversas afecciones tales como asma, reumatismo, quemaduras externas e internas, bronquitis tuberculosis, heridas, entre otras afecciones (Custódio y Veiga-Junio, 2012)

Este compuesto presenta diversas propiedades beneficiosas para la salud entre las que se destacan su acción como agente regenerante y epitelizante de la piel (Martinetz y Hartwig, 1998). También es utilizado en aromaterapia (Zimmermann, 2008). Sumado a esto, también hay investigaciones que estudiaron la aplicación de este aceite en el área de cosmética (Martinez y col., 1998).

Desde el punto de vista de su composición química, el aceite esencial de cabreuva está compuesto mayoritariamente por *trans*-nerolidol (Figura 4.1), un sesquiterpeno acíclico que presenta una baja solubilidad en agua. Este sesquiterpeno presenta capacidad antimicrobiana demostrada frente a diversos microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Aspergillus niger* (Tao y col., 2013). Para que esta actividad antimicrobiana sea efectiva se debe tener en cuenta la solubilidad del nerolidol.

a



b



Figura 4.1. **a)** Estructura química del *trans*-nerolidol y **b)** fotografía de *Myrocarpus fastigiatus*, especie arbórea a partir de la que se extrae el aceite esencia de cabreuva.

Para mejorar la funcionalidad y ampliar las potenciales aplicaciones de los aceites esenciales es necesario encontrar estrategias para reducir su volatilidad. Una alternativa es la formación de micro y nanocápsulas como vehículos portadores y protectores de estos compuestos activos. En la actualidad, se utiliza una amplia variedad de polímeros para

encapsular aceites esenciales y compuestos volátiles entre los que se destacan las ciclodextrinas (Azzi y col., 2017) y biopolímeros como el quitosano (Yoksan y col., 2010).

Existen diversos trabajos que han utilizado el anión tripolifosfato sódico para encapsular aceites esenciales mediante un mecanismo de gelificación ionotrópica (Calvo y col., 1997; Lamarra y col., 2016; Yoksan y col., 2010) siendo una alternativa la utilización de citrato de sodio como agente entrecruzante (Mardila y col., 2016).

Para superar el problema de la baja solubilidad del cabreuva, se debe plantear la síntesis de un sistema de dos fases, compatibilizadas con un agente tensoactivo. En trabajos previos (Li y col., 2009; Sunintaboon y col., 2012) se ha informado que existe una interacción de tipo electrostática entre el quitosano y el surfactante dodecil sulfato sódico (SDS), que permite la formación de emulsiones estables.

4.1.2. Difusión de aceite esencial en piel

En general los terpenos y sesquiterpenos han sido ampliamente utilizados en tratamientos de pieles, debido a su capacidad de penetración a través de las barreras del estrato córneo (Can y col., 2013; Garj y col., 2014). Garj y col. (2014) utilizaron eugenol encapsulado en nanopartículas de carbopol, observando una adecuada penetración en pieles. Asimismo, Pudney y col. (2007) estudiaron la penetración del compuesto trans-retinol en piel humana, realizando un ensayo *in vivo* para evaluar la cantidad de compuesto activo que atraviesa el estrato córneo a través del uso de microscopia confocal Raman. Can y col. (2013) utilizaron nerolidol para aumentar la penetración de terbinafina en muestras de piel. La capacidad de mejorar la penetración que posee el nerolidol se atribuye a su habilidad para aumentar la fluidez de las membranas lipídicas de las células presentes en el estrato córneo (Mendanha Neto, 2014). La Figura 4.2 muestra un esquema representativo del modelo de membrana lipídica expuesta en contacto con compuestos terpenoides.

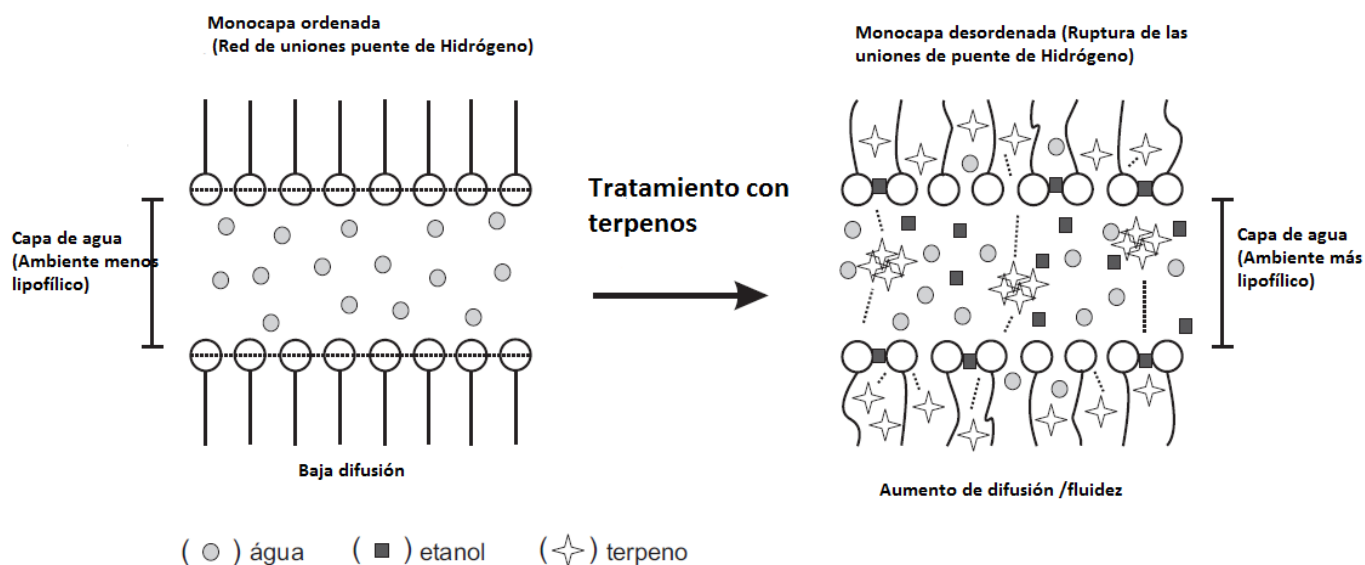


Figura 4.2. Modelo de membrana lipídica tratada con terpenos. Figura adaptada de Mandanha Neto (2014).

Para la aplicación de este tipo de compuestos en tratamientos dérmicos se plantea la utilización de *parches* que permitan la vehiculización de compuestos activos a través de la piel, atravesando las distintas regiones del estrato córneo (Can y col., 2013). Este tipo de sistemas transdérmicos generalmente están compuestos por materiales poliméricos los cuales permiten regular la dosificación de las drogas a utilizar, sumado a las adecuadas propiedades mecánicas que ofrecen estos sistemas. Hay varios estudios en los cuales se han utilizado materiales poliméricos biodegradables (Güngör y col., 2008).

Uno de los polímeros más utilizados con este fin es el alcohol polivinílico (PVA), producto de su inherente no toxicidad, no carcinogenicidad, excelente biocompatibilidad, buenas propiedades mecánicas, y gran capacidad de hinchamiento en soluciones acuosas (Zhang y col., 2015).

En este marco, los objetivos planteados en esta etapa fueron:

- Sintetizar emulsiones (O/W) a base de PVA, quitosano y aceite esencial de cabreuva y seleccionar la concentración de los componentes que permitan la formulación de emulsiones termodinámicamente estables
- Desarrollar películas de PVA que actúen como soportes de las emulsiones seleccionadas
- Estudiar las propiedades físicoquímicas, mecánicas y estructurales de las matrices desarrolladas
- Seleccionar una matriz funcionalizada con AE para su posterior aplicación como dispositivo de liberación controlada, apósito para uso tópico
- Analizar en perfil de penetración del aceite esencial de cabreuva a través de ensayos de difusión *ex vivo*/ *in vivo*
- Evaluar la citotoxicidad del aceite de cabreuva, de las emulsiones y de los apósitos diseñados

4.2. Materiales

Para la obtención de las emulsiones se utilizó quitosano, alcohol polivinílico (PVA) con un grado de hidrólisis de 98% y un peso molecular de 78.000 M_w suministrado Polysciences Inc. Como agente surfactante se utilizó el dodecil sulfato sódico (Cicarelli, Argentina) y como entrecruzante citrato sódico (Cicarelli, Argentina). Asimismo, se usó aceite esencial de cabreuva suministrado por Esencias de Bosque (La Plata, Argentina) como agente activo.

4.3. Metodología

4.3.1 Caracterización del aceite esencial de cabreuva (AE)

Se realizó un análisis químico del aceite esencial de cabreuva para obtener su composición química relativa a través de cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas. El aceite esencial se analizó por GC-FID-MS, empleando un equipo Perkin Elmer modelo Clarus 500 provisto de un único inyector tipo splits (relacion de splits: 1:100) conectado con un

divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido: a) polietilenglicol de PM aprox. 20.000 (DB-Wax, J&W Scientific) y b) 5% fenil-95% metil silicona (DB-5, J&W Scientific), ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 25 μm de espesor de fase estacionaria. La columna polar está conectada a un detector FID mientras que la columna no polar está conectada a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de un sistema de venteo (MSVent®).

Las condiciones de la corrida fueron: gas *carrier*: Helio a 1,87 ml min^{-1} . Temperatura de inicio del ensayo 90°C, luego a 3°C min^{-1} la temperatura se llevó hasta los 225°C (15 min). Las temperaturas de inyector y detectores FID fueron de 255°C y 275°C, respectivamente. Cantidad inyectada: 0,2 μl de una dilución al 10% en etanol. Temperatura de la línea de transferencia: 180°C. Temperatura de la fuente de iones: 150°C. Rango de masas escaneado: 40-350 Da.

La identificación de los compuestos se realizó por sus índices de retención en las dos columnas empleadas, respecto de una serie homóloga de hidrocarburos $\text{C}_8\text{-C}_{20}$, y paralelamente identificados por comparación de sus espectros de masa con los que figuran en la base de datos. La composición porcentual se determinó por el método de porcentajes de áreas, sin corrección por diferencias de respuesta. Se tomó para cada componente la menor respuesta obtenida entre las correspondientes a cada columna usada.

4.3.2 Análisis microbiológico del aceite esencial de cabreuva (AE)

4.3.2.1. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial se determinó frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Para ello se utilizó la técnica modificada descrita por Gracia-Valenzuela y col. (2012). A partir de un cultivo puro de las distintas cepas en agar nutritivo se preparó una suspensión en solución fisiológica ajustando la turbidez (aprox. $1,5 \times 10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$).

Capítulo 4: Desarrollo y aplicación de un apósito funcionalizado

Se prepararon diferentes diluciones en el rango 0,1-30% v/v del AE en polietilenglicol (PEG). Diluciones seriadas de muestras (200 µl) se incorporaron a 500 µl caldo de cultivo (Mueller-Hinton) y se inocularon con 500 µl del inóculo correspondiente. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. La menor concentración de AE que produjo una inhibición completa del desarrollo visible y no exhibió crecimiento en placa representó la CMI.

4.3.2.2. Inhibición de bacterias en placas con AE

Placas de medio con agar Mueller-Hinton fueron previamente inoculadas por dispersión en toda la superficie con 100 µL de suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* procedentes de la cátedra de microbiología (Universidad Nacional de La Plata). Posteriormente, se colocaron discos de papel estéril con diámetro de 5 mm embebidos en 10 µL del AE con distintas concentraciones en el rango 1-30% v/v. Los ensayos en placas se realizaron por triplicado e incubaron durante 24 horas a 37°C. Finalmente, se midió el diámetro en mm del halo de inhibición generado por el AE sobre el medio de cultivo.

4.3.3 Formulación de las emulsiones

La formulación de las emulsiones aceite en agua (O/W) se llevó a cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito por Li y col. (2009). Para analizar el efecto del SDS y el quitosano se evaluaron 4 formulaciones (Tabla 4.1), a las cuales se les midió el potencial zeta, el tamaño de partícula y la estabilidad física mediante un analizador vertical de barrido (QuickScan) (Figura 4.3).

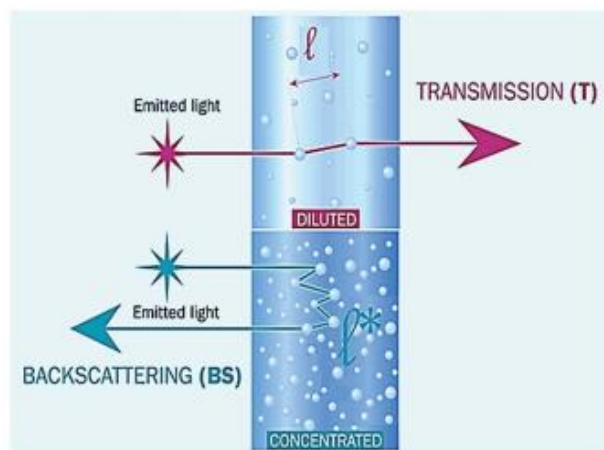


Figura 4.3. Principio de funcionamiento del QuickScan. Adaptado de Lu y col. (2017).

Las concentraciones seleccionadas del agente tensoactivo (SDS) se solubilizaron en agua, luego se incorporó la solución de quitosano al 0,75% p/v y posteriormente se agregó la solución de PVA al 0,75% p/v. Finalizado este proceso, se adicionó el aceite esencial de cabreuva por goteo mientras la solución se homogenizaba a través de un equipo Ultraturrax T-25 (Janke y Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania) a 21.000 rpm durante 10 min. Por último, para disminuir el tamaño de gota y aumentar la estabilidad, la emulsión se sometió a un tratamiento de ultrasonido empleando un equipo ultrasónico Sonics VCX-750 (Vibra Cell, USA). a una potencia de 750 W y 40% de amplitud durante 5 min.

Tabla 4.1. Formulaciones utilizadas para sintetizar emulsiones

Emulsiones	Concentración de Q (% p/v)	Concentración de PVA (% p/v)	Concentración de SDS (g l^{-1})	Concentración de cabreuva (AE) (% v/v)
E ₁	-	0,75	0,5	7,5
E ₂	0,75	0,75	0,5	7,5
E ₃	-	0,75	1	7,5
E ₄	0,75	0,75	1	7,5

La optimización de las emulsiones se llevó a cabo a través del estudio de la estabilidad de las mismas. En base a estos resultados se seleccionó la formulación que contenía quitosano y una concentración de SDS de 1 g l^{-1} . El entrecruzamiento de las emulsiones se realizó empleando dos concentraciones de citrato sódico (CT) (Tabla 4.2).

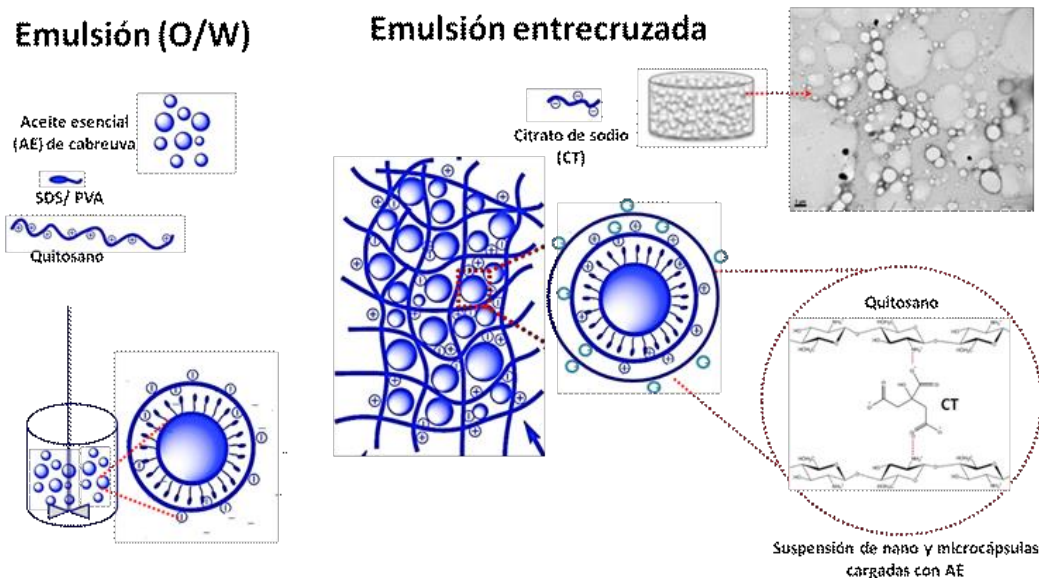


Figura 4.4. Esquema representativo de los sistemas obtenidos: emulsión (O/W) y emulsiones entrecruzadas con citrato de de sodio.

4.3.4 Estudio de las emulsiones

La evaluación de las emulsiones formuladas se efectuó midiendo la carga superficial a través de medidas de potencial zeta, distribución de tamaño de partícula y estabilidad física de las emulsiones. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas fue determinados mediante la técnica de dispersión estática de luz, también conocida como técnica de difracción láser. Las determinaciones se realizaron en un analizador de partículas Malvern Mastersizer 2000E con un sistema de dispersión Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) provisto de un haz de laser He/Ne a 633 nm a un ángulo fijo de dispersión de 173° y un correlator digital modelo ZEN3600. Por otra parte, usando un equipo

equipo Horiba Scientific – Modelo SZ-100Z (Malvern Instruments Ltd) se determinaron los valores de potencial zeta (PZ) de las emulsiones. Asimismo, la morfología de las emulsiones formadas fue caracterizada a través de microscopia electrónica de transmisión (TEM).

4.3.5 Síntesis de películas compuestas

Las distintas formulaciones filmogénicas descritas en la Tabla 4.2 se obtuvieron dispersando distintas proporciones de las emulsiones entrecruzadas con CT en dos concentraciones (0,125 y 0,250 % p/v) en soluciones de PVA preparadas en una concentración del 1% p/v. Luego las suspensiones filmogénicas se extendieron en moldes de teflón, y se secaron en estufa a 37°C hasta peso constante. Las matrices compuestas fueron acondicionadas a 20°C y a una humedad controlada del 65% para los posteriores ensayos. Para estudiar la influencia de la inclusión de las emulsiones entrecruzadas en las propiedades de los materiales obtenidos, se utilizó con fines comparativos una película de PVA al 1% p/v. La Tabla 4.2 muestra la nomenclatura utilizada en la formulación de las películas compuestas.

Tabla 4.2. Concentración de citrato de sodio (CT) y relación emulsión entrecruzada EE_{A,B}-PVA utilizada para la formulación de las películas compuestas

Películas	Relación	Concentración de CT
	EE _{A,B} :PVA (p/p)	(% p/v)
EE _A -PVA	2:3	0,125
	1:1	0,125
	3:2	0,125
EE _B -PVA	1:1	0,250

EE_A: Emulsión entrecruzada con citrato sódico al 0,125% p/v

EE_B: Emulsión entrecruzada con citrato sódico al 0,250% p/v

4.3.6 Propiedades fisicoquímicas de las películas compuestas

Las determinaciones de humedad se realizaron en estufa en condiciones de vacío, P= 500 mbar y a una temperatura de 60°C, hasta alcanzar peso constante. Para los ensayos de solubilidad se cortaron muestras de 2×2 cm² de cada película, se pesaron con precisión de 0,0001 g y se colocaron en vasos de precipitado con 80 ml de agua destilada. Las muestras mantuvieron bajo agitación constante durante 1 hora a 20 °C. Las piezas remanentes de películas se secaron en una estufa a 60 ± 1°C hasta peso constante, en condiciones de vacío.

4.3.7 Análisis estructurales, mecánicos y de barrera

El análisis estructural de las matrices sintetizadas se realizó a través de DSC Y DRX (Capítulo 3, sección 3.3). Asimismo, se estudiaron las propiedades mecánicas y de barrera siguiendo los procedimientos ya descriptos en el Capítulo 3.

4.3.8 Análisis espectroscópico

Para estudiar las interacciones establecidas entre los grupos funcionales de las nanopartículas y la matriz soporte, se utilizó un equipo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Nicolet, iS10 ThermoScientific, Madison, USA) en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Los datos registrados en el rango de 400-4000 cm⁻¹ por acumulación de 64 escaneos con una resolución de 4 cm⁻¹ fueron analizados usando el software Omnic 8 (ThermoScientific).

4.3.9 Aplicaciones de los apósitos desarrollados

4.3.9.1 Ensayos ex vivo

Los ensayos de difusión del compuesto activo se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Montanari y col. (2010).

Se utilizaron muestras almacenadas a -20°C de piel abdominal de un donante sano de sexo masculino adulto proveniente de una operación gástrica realizada en los meses invernales de

junio-julio. La piel fue transportada desde el quirófano al laboratorio en un recipiente hermético con hielo y se mantuvo congelada a -20°C hasta su posterior uso.

Se cortaron discos circulares de piel ejerciendo presión con un sacabocados de 24 mm de diámetro. Para este ensayo, se utilizó un dispositivo de penetración en condiciones no oclusivas (variante ad-hoc SPM, modelo de Penetración de Saarbrücken, SPM) fabricado con una pieza de teflón con una cavidad cilíndrica de fondo plano de 25 mm de diámetro y 5 mm de profundidad (Figura 4.5).

Sobre el fondo de la cavidad se colocó un disco de papel de filtro del mismo diámetro que el dispositivo embebido en 200 μl de buffer TRIS 1X con el fin de crear condiciones de elevada humedad en el interior de la pieza de teflón. Una vez montado el explanto, con el estrato córneo hacia arriba sobre el SPM, se procedió a la aplicación del aceite esencial puro y de discos de películas compuestas sobre el mismo.

Para estudiar el nivel de penetración del compuesto activo en las muestras de piel se cortaron películas con un espesor aproximado de 120 μm del mismo diámetro que el de la muestra de piel. Para asegurar un contacto perfecto (sin oclusión de aire) piel-película se utilizó un peso de 22 g. Por otra parte, se ensayaron aplicaciones directas del compuesto activo con cantidades equivalentes a las de AE presente en una película del mismo diámetro que la cavidad del SPM. La Figura 4.5 esquematiza los sistemas ensayados.

Previo al análisis difusivo del AE, las muestras fueron incubadas en estufa a 37°C en recipientes herméticos con agua para asegurar una atmósfera circundante de aproximadamente 100% durante distintos tiempos de contacto (1, 4, y 8 h) en el caso de las películas y en aplicaciones directas del compuesto activo 1 hora.

Ensayos de penetración del aceite esencial de cabreuva



Figura 4.5. Esquema representativo de los ensayos *ex vivo* de penetración del compuesto activo usando dispositivo un SPM: **a)** contacto directo con aceite esencial; **b)** contacto con película funcionalizada con aceite esencial de cabreuva.

4.3.9.2 Cuantificación de la penetración del aceite esencial

Para cuantificar la penetración del aceite esencial difundido desde el apósito a muestras de pieles previamente sometidas al proceso de difusión *ex-vivo* se las disgregó y se trataron con una solución de metanol al 75% v/v, por un período de 1 hora. Una vez terminado este proceso los sobrenadantes fueron filtrados con filtro de acetato de Celulosa (0,44 μm) para luego cuantificar el contenido de compuesto activo mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC en fase reversa.

Para cuantificar por HPLC se utilizó una columna C18 5 μm Licosphere 100. Se usaron dos fases móviles compuestas por: a) agua ultrapura grado HPLC (filtrada 0,22 micrones) y ácido trifluoroacético (TFA, Biopack) al 0,05% v/v y b) metanol (Grado HPLC) y TFA preparado al 0,05% v/v. Con estas dos fases móviles se programó un gradiente de solventes para generar una separación más eficiente de los picos de las muestras de aceite esencial. Este gradiente se dividió en 6 etapas: 1) tiempo 0 min, 25% A y 75%B, 2) tiempo 7,5 min, 25% A y 75% B, 3)

tiempo 20 min, 100% B, 4) tiempo 22 min, 100% B, 5) tiempo 23 min, 25% A y 75 % B, 6) tiempo 30 min, 25% A y 75% B.

Los analitos eluidos se detectaron a 225 nm. Para cuantificar el compuesto activo, se realizó una curva de calibración con soluciones patrón de trans-nerolidol (Sigma Aldrich, USA) preparadas por disolución en la fase móvil. En el intervalo de 8 a 1000 ppm, obteniéndose un límite de detección de 24 ppm y un límite de cuantificación de 41 ppm.

4.3.9.3 Análisis difusivo del compuesto activo y seccionamiento óptico por CSLM

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco (Figura 4.6). Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde, 1990). El método de trabajo del microscopio confocal es por epiluminación, es decir con muestras que al incidir la luz sobre ellas reflejan toda o parte de la luz incidente (microscopía de reflexión), o emiten luz en una longitud de onda superior (microscopía de fluorescencia). El primer caso se suele utilizar con muestras opacas, principalmente en estudios de materiales, mientras que la fluorescencia se utiliza principalmente con muestras biológicas.

Se denomina fluorescencia a la propiedad que tienen ciertas moléculas al absorber luz de una determinada longitud de onda y emitir luz en una longitud de onda superior. La fluorescencia puede darse de forma natural en determinadas sustancias denominándose fluorescencia primaria o autofluorescencia. En otros casos para que la muestra tenga fluorescencia es preciso teñirla con un marcador fluorescente, denominado fluorocromo, denominándose fluorescencia secundaria (Figura 4.6). Todos los fluorocromos se caracterizan por su espectro de excitación y su espectro de emisión. El espectro de excitación es el rango de longitudes de onda en las que un fluorocromo absorbe luz, o lo que es el mismo es excitado. El espectro de emisión es el rango de longitudes de onda en las que un fluorocromo emite luz. Ambos espectros presentan dos picos que se corresponden con la máxima absorción y la máxima emisión.

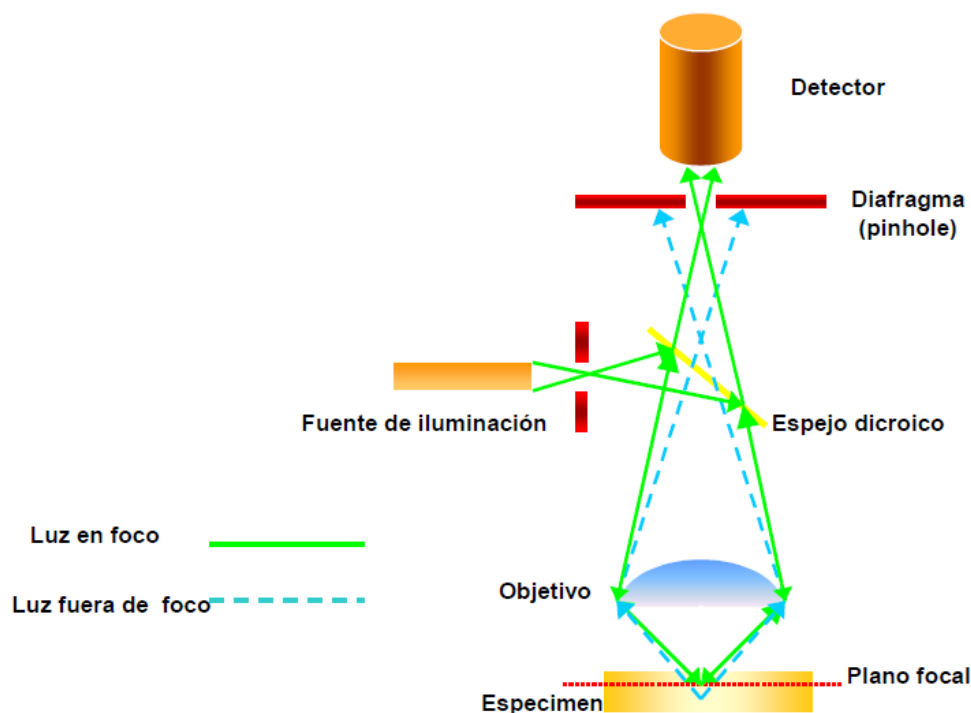


Figura 4.6. Esquema del principio de microscopía confocal adaptado de Nistal (2013).

Dado que sólo se ilumina una pequeña zona de la muestra (punto), para poder visualizarla se necesita un sistema de barrido que permita muestrear todos los puntos y un sistema de formación de la imagen donde se recoja la información de cada uno de estos puntos. El sistema de barrido puede ser de dos tipos: que el haz del láser se desplace por la muestra (*beam scanning*) o que sea ésta la que se desplace, mientras el haz permanece inmóvil (*stage scanning*) (Wright y col., 1993).

La luz reflejada o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. La mayoría de los sistemas cuentan con varios fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger en cada uno de ellos diferentes longitudes de onda.

Capítulo 4: Desarrollo y aplicación de un apósito funcionalizado

Se efectuó un corte rectangular del círculo de piel (explanto) en contacto con la película y con el compuesto activo (AE), se congeló a -80°C y se realizaron cortes histológicos de $20\text{ }\mu\text{m}$ de espesor. Para realizar los cortes de las muestras congeladas se utilizó un criostato LeicaCM 1850 mantenido a -28°C . Los cortes colocados sobre portaobjetos fueron observados en un microscopio confocal láser Olympus FV300 a 405 nm .

Para los llevar a cabo los análisis de seccionamiento óptico del explanto también se usó el microscopio confocal láser Olympus FV300 con un aumento de 20X y un láser DAPI. Para evaluar el perfil de penetración se realizó un barrido desde el eje Z (desde $0\text{ }\mu\text{m}$ correspondiente a la superficie, hasta $60\text{ }\mu\text{m}$ de profundidad) y se obtuvieron 20 imágenes tomadas cada $10\text{ }\mu\text{m}$ de profundidad. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Fiji Image J el cual permitió realizar una estimación de la intensidad de fluorescencia para cada sonda, en cada sección del explanto considerada. Posteriormente, se seleccionaron cuadrados de 200×200 pixeles (utilizando el mismo programa) en los extremos superiores e inferiores de cada una de las fotografías y se realizó un promedio de la fluorescencia emitida en los cuatro cuadrantes para cada imagen de $10\text{ }\mu\text{m}$ de profundidad. A partir de los resultados obtenidos, se graficó la fluorescencia en función de la profundidad de las capas seleccionadas.

Una propiedad interesante que presenta el aceite esencial de cabreuva es su fluorescencia intrínseca. Esto permitió llevar a cabo la observación mediante CSLM sin el uso de marcadores cromóforos. Los espectros de fosforescencia a temperatura ambiente se registraron con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) provisto de una lámpara pulsada de xenón como fuente de excitación (ancho de pulso $<10\text{ }\mu\text{s}$, 60 Hz) y un fotomultiplicador R928. El instrumento se encuentra conectado a una PC para el almacenamiento y tratamiento de datos a través del software FL Winlab.

La Figura 4.7 exhibe el espectro de fluorescencia del aceite esencial de cabreuva. La fluorescencia del aceite esencial se produce a 275 nm , generando un máximo de emisión cercano a 341 nm , por lo cual resultó adecuado la utilización del filtro DAPI para el análisis de

las imágenes; esta emisión de fluorescencia podría ser atribuida a la presencia de isoflavonas en el aceite (Harborne y col., 1963).

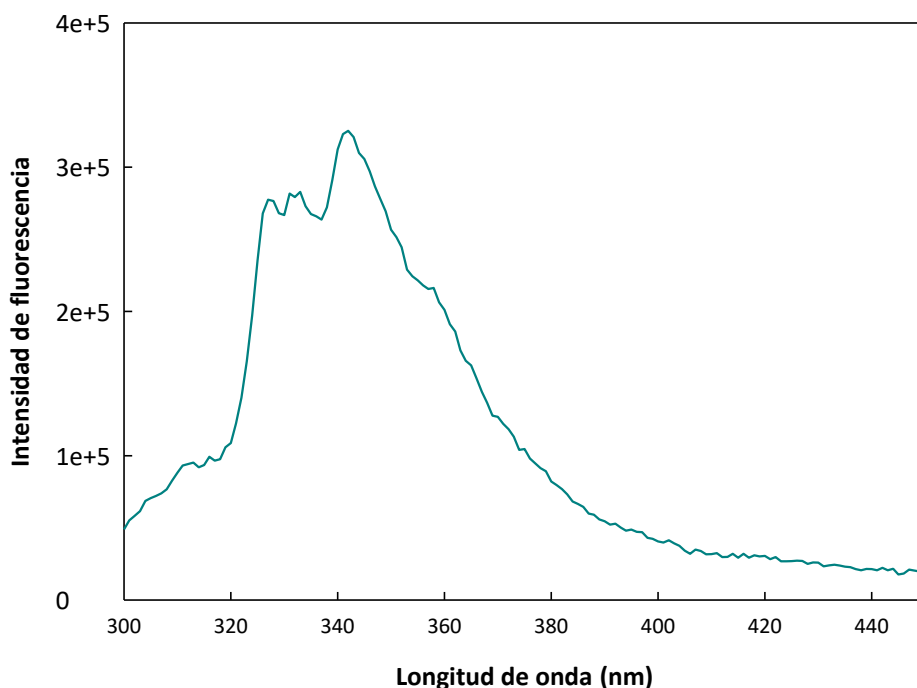


Figura 4.7. Espectro de fluorescencia de aceite esencial de cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*)

4.3.9.4 Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar el efecto citotóxico del aceite esencial de cabreuva, dado que el mismo no es soluble en agua, se prepararon diluciones del compuesto con diferentes concentraciones (1,85, 3,75, 7,5, y 15% v/v) usando SDS en una concentración de 1g l^{-1} como agente tensoactivo para emulsionar el compuesto activo. Las soluciones previamente preparadas se homogeneizaron a 21.500 rpm. Asimismo, se evaluó la citotoxicidad de una solución de SDS de concentración 1g l^{-1} y de las emulsiones entrecruzadas utilizadas para formular las películas.

Una vez obtenidas las soluciones se realizaron los ensayos de citotoxicidad siguiendo el protocolo descrito por Bucci y col. (2017). Para ello se incubaron células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos a las cuales se les suplementó suero fetal bovino al 10% v/v y una mezcla de antibiótico y antimicóticos preparada al 1% (penicilina g, estreptomicina y anfotericina B) y 2mM de glutamina al 2%. Se sembraron por separado en placas de 96 pocillos (*wells*) obteniendo una concentración de 5×10^3 células por *well*. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C en estufa con 5% de dióxido de carbono (CO₂) hasta que se observó una confluencia del 85%. Las células se pusieron en contacto con las soluciones por un período de 24 horas para luego obtener el valor de viabilidad celular a través del ensayo de MTT (Bucci y col., 2017). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa dando un compuesto coloreado de color azul, generando una sal insoluble (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular (Wagemarker y col., 2015). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para evaluar la citotoxicidad de las películas EE_A-PVA con y sin aceite esencial de cabreuva se usó un protocolo similar al utilizado por Wang y col. (2013). Para ello, las películas obtenidas se pusieron en contacto directo con el medio de cultivo celular durante 24 horas, para luego realizar los ensayos de citotoxicidad como se mencionó previamente.

4.3.9.5 Ensayos de regeneración celular

Para observar la regeneración celular se utilizó un ensayo similar al descrito por Bucci y col. (2017). En este ensayo las células de la línea HaCat-a fueron incubadas durante 24 horas hasta llegar a un conteo de 4×10^4 células por pocillo. Luego de esto se hizo una estría sobre la monocapa formada en el pocillo (césped), para luego cambiar el medio (DMEM) y agregar en pocillos diferentes las películas PVA, EE_A-PVA 1:1 y EE_{AV}-PVA 1:1 sin AE, manteniéndose en contacto durante 24 horas. Una vez realizado el proceso se retiraron el medio y la película, se tiñeron las células con azul de metileno y se observó si se produjo o no regeneración.

4.3.9.6 Ensayos *in vivo*

Para realizar este ensayo se seleccionaron distintos individuos agrupados por rango etario y sexo a los cuales se les colocó tres apósitos en la región del antebrazo. A intervalos definidos de tiempo (1 hora, 4 horas y 7 horas) se removieron los apósitos y de esa región se extrajeron fracciones del estrato córneo utilizando una cinta adhesiva (Rapifix) a través del proceso de *tape stripping* (Bucci y col. 2017; Montanari y col., 2010). Se realizaron espectros ATR-FTIR de las distintas cintas (1C, 2C, 3C, 4C y 5C) correspondientes a la remoción de diferentes capas de piel, con el objetivo de evaluar el nivel de penetración del aceite esencial difundido desde el apósito hacia las pieles ensayadas. Se determinaron como controles los espectros de la cinta sola y de las pieles del antebrazo de los individuos antes de su contacto con el apósito.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de cabreuva

En la Tabla 4.3 se resume la composición porcentual del aceite esencial de cabreuva. Como se puede observar el aceite está compuesto mayoritariamente por *trans*-nerolidol (78,9%). Este resultado concuerda con los valores informados por Schubert y col. (1992) quienes encontraron un contenido comprendido entre 58 y 80% de *trans*-nerolidol en muestras de aceite de cabreuva.

Tabla 4.3. Composición química del aceite esencial de cabreuva

Compuesto	%
Alfa copaeno	T
Geranil acetona	0,5
Trans beta farneseno	0,3
Cabreuva óxido B	0,4
Cabreuva óxido D	0,3
Ar curcumeno	0,1
Transtrans alfa farneseno	0,5
10-epizonareno	0,1
Alfa muruleno	0,4
Beta bisaboleno	1,4
Cis gama bisaboleno	0,2
Gama cadineno	0,3
Delta cadineno	0,6
Transcalemeneno	0,1
Trans gama bisaboleno	0,1
Trans alfa bisaboleno	0,7
Transnerolidol	78,9
Cubenol 1, 10- di epi	0,2
Tau cadinol	0,3
Tau murolool	0,2
Alfa murulol (torreyol)	0,2
Alfa cadinol	0,5
Epi alfa bisabolol	1,0
Alfa bisabolol	1,9
Cistransfarnesol	0,4
Transtransfarnesol	1,7
Total	91,4

4.4.2 Análisis de estabilidad de emulsiones

En la Tabla 4.4 se resumen el potencial zeta de las distintas emulsiones evaluadas.

Tabla 4.4. Valores de potencial zeta de las distintas emulsiones ensayadas

Muestra	Potencial zeta (mV)
E ₁	-9,1±1,4 ^a
E ₂	65,8±0,7 ^b
E ₃	-40,6±0,4 ^c
E ₄	74,8±4,0 ^d

* Letras distintas indican diferencias significativas entre muestras

Como puede observarse en la Tabla 4.4 los valores positivos de potencial zeta se relacionaron con la presencia de quitosano en la formulación de las emulsiones y la carga superficial generada por la presencia de grupos amino protonados (en medio ácido) (Lamarra y col., 2016). Los valores negativos obtenidos en las emulsiones con mayor contenido de SDS se atribuyeron a la presencia de cargas negativas al pH de trabajo (Chatterjee y col., 2014).

Este cambio en los valores de PZ con el agregado de quitosano indicaría la coexistencia de interacciones principalmente de tipo iónicas entre el Q y el SDS, compuestos presentes en la fase continua de la emulsión (Sunintaboon y col., 2012). Diamant y col. (2000) remarcaron que existen interacciones de tipo polímero-surfactante entre ambos compuestos. Asimismo, el aumento del PZ hasta valores positivos altos confirmaron la presencia de quitosano formando parte de la emulsión, así como libre en la solución (Chatterjee y col., 2014).

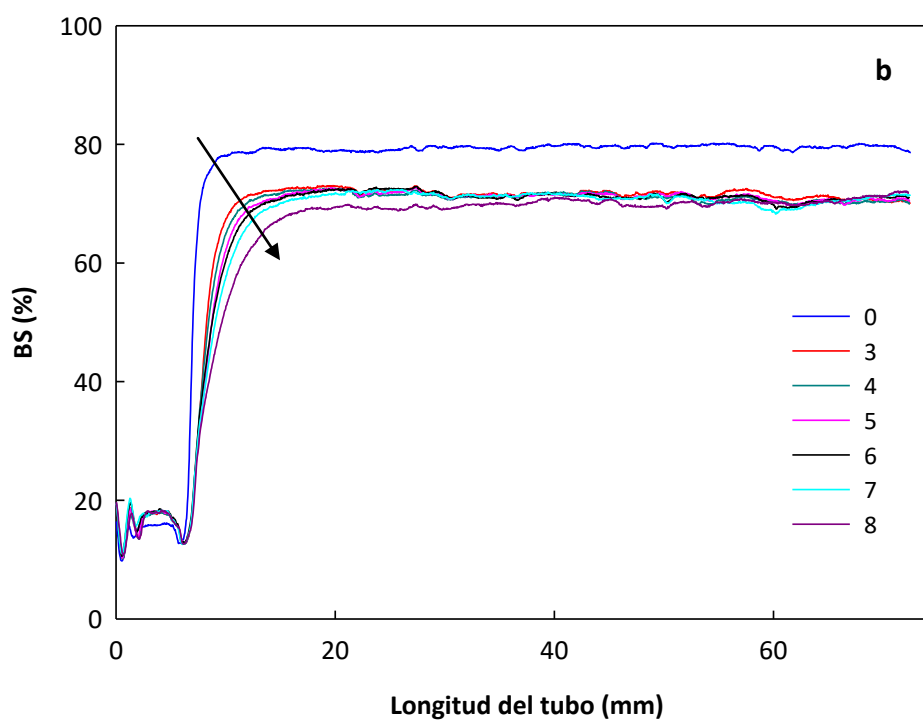
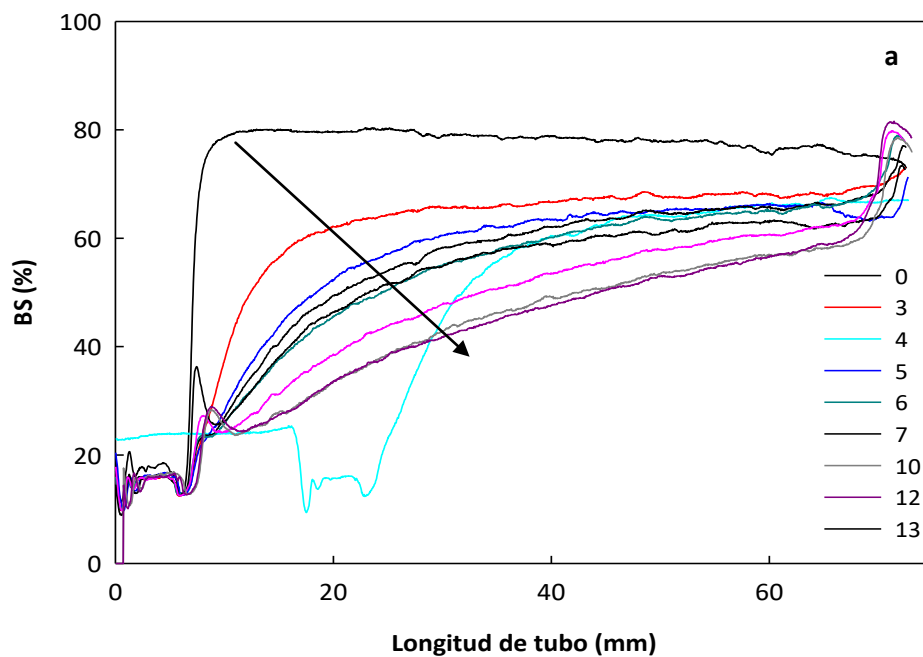
Es pertinente aclarar que los polielectrolitos catiónicos como el quitosano tienen la capacidad de ensamblarse formando una capa o *film* interfasial sobre la gota de aceite recubierta con el anión SDS (Mun y col., 2005). De acuerdo a Mun y col. (2005), las gotas que forman parte de la emulsión adsorben la cantidad suficiente de quitosano para obtener una carga positiva y así repelerse entre sí.

Capítulo 4: Desarrollo y aplicación de un apósito funcionalizado

Como es conocido, sistemas con valores de potencial zeta mayores a 30 mV (en valor absoluto) se clasifican como sistemas estables, con una menor tendencia a formar agregados (Ramadan y col., 2016 y Wang y col., 2011).

Se analizó también la estabilidad física de las emulsiones obtenidas. En la Figura 4.9 se pueden observar los distintos perfiles de *BackScattering* de las mismas.

Para las diferentes concentraciones de surfactante agregado (0,5 y 1 g l⁻¹) se pudo observar que la presencia de quitosano mejoró la estabilidad de las emulsiones (Figura 4.8 b y d). En las formuladas sin quitosano se visualizó un proceso de cremado (Figura 4.8 a y c) ya que las gotas migraron hacia la parte superior produciéndose una separación de fases (Julio y col., 2018; Mengual y col., 1999) (Figura 4.8 a y c). La formación de este proceso si bien trae aparejado una modificación en el perfil de *Backscattering* no implica que se observe a simple vista una separación de fases (Di Giorgio y col., 2019).



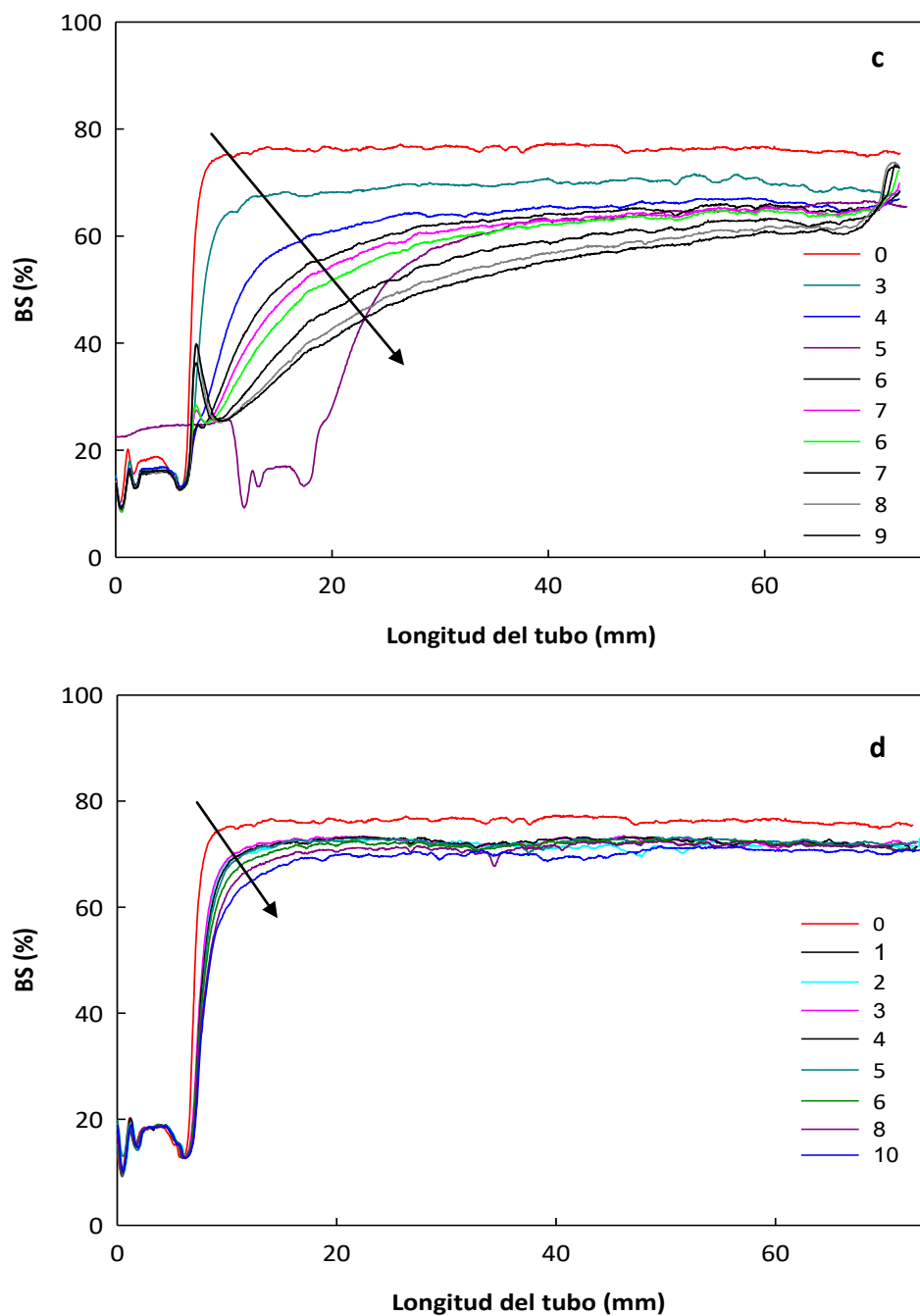


Figura 4.8. Perfiles de *BackScattering* (%) de las distintas emulsiones: **a)** E₁ (SDS 0,5 g l⁻¹); **b)** E₂ (Q/SDS 0,5g l⁻¹); **c)** E₃ (SDS 1 g l⁻¹) y **d)** E₄ (Q/SDS 1 g l⁻¹). La flecha indica la evolución con el tiempo desde t=0 hasta más de 8 días.

En las emulsiones formuladas con quitosano pocos cambios en el BS indicaron que no hubo un evidente crecimiento de las gotas o migración de la emulsión. No se produjo el fenómeno, de cremado aunque si se observó una leve disminución en el valor de BS. Este proceso también fue informado por Julio y col. (2018) quienes determinaron que el agregado de quitosano a emulsiones de aceite de chia y lecitinas genera una reducción en el valor de BS. Los autores lo asignaron al aumento de la viscosidad de la fase continua reduciendo así la movilidad de las gotas de aceite. También sostuvieron que este efecto estabilizante podría ser el resultado de la combinación entre el aumento de viscosidad y la repulsión de tipo electrostática entre las gotas de aceite.

Este efecto de repulsión se vio reflejado en los valores de PZ al analizar las cargas superficiales de las gotas formadas, como se discutió en párrafos anteriores. Otros autores afirman que la combinación de un surfactante con un polielectrolito genera una significativa disminución de la tensión superficial debido a la adsorción del polímero en la interfase, lo cual implica una mayor estabilidad del sistema (Stamkulov y col., 2009).

La incorporación de SDS como agente tensoactivo de carácter aniónico generó un perfil más estable de las emulsiones. Considerando el tamaño pequeño de la molécula, este compuesto reduce la tensión interfásial y es capaz de formar una capa protectora sobre las gotas de aceite generando repulsión entre las mismas (Silva y col., 2015).

A partir del análisis de la distribución de tamaño (Figura 4.9) se desprende que la formulación E₁ presentó el mayor tamaño de gotas, mientras que el agregado de quitosano desplazó la distribución hacia valores menores (E₂ y E₄). Sumado a esto, la inclusión de una mayor cantidad de SDS en la formulación que contiene Q condujo a una mayor reducción en el tamaño, en tanto que el agregado de citrato sódico como entrecruzante de la emulsión no influyó en los perfiles obtenidos. Estos resultados se correlacionan con la tendencia observada para el PZ, así como con los análisis de estabilidad de emulsiones, reforzando la idea de una disminución o retraso en la coalescencia de las gotas que forman parte de la emulsión, debido a la presencia de Q y SDS. Hou y col. (2010) quienes trabajaron con emulsiones compuestas por β -carotenos estabilizados por polisacáridos de soja solubles y

quitosano llegaron a resultados análogos. Si bien a bajas concentraciones observaron un aumento en el tamaño de gota con el aumento en la concentración de Q, al llegar a una concentración crítica, el tamaño de gota empezó a disminuir hasta llegar a un valor estable. Según Aoki y col. (2005) la presencia de quitosano en emulsiones compuestas por aceite de maíz con SDS genera un aumento en el tamaño de gota producto de la floculación *bridging*. Un efecto contrario se logra mediante la aplicación de un proceso de sonicación de las emulsiones.

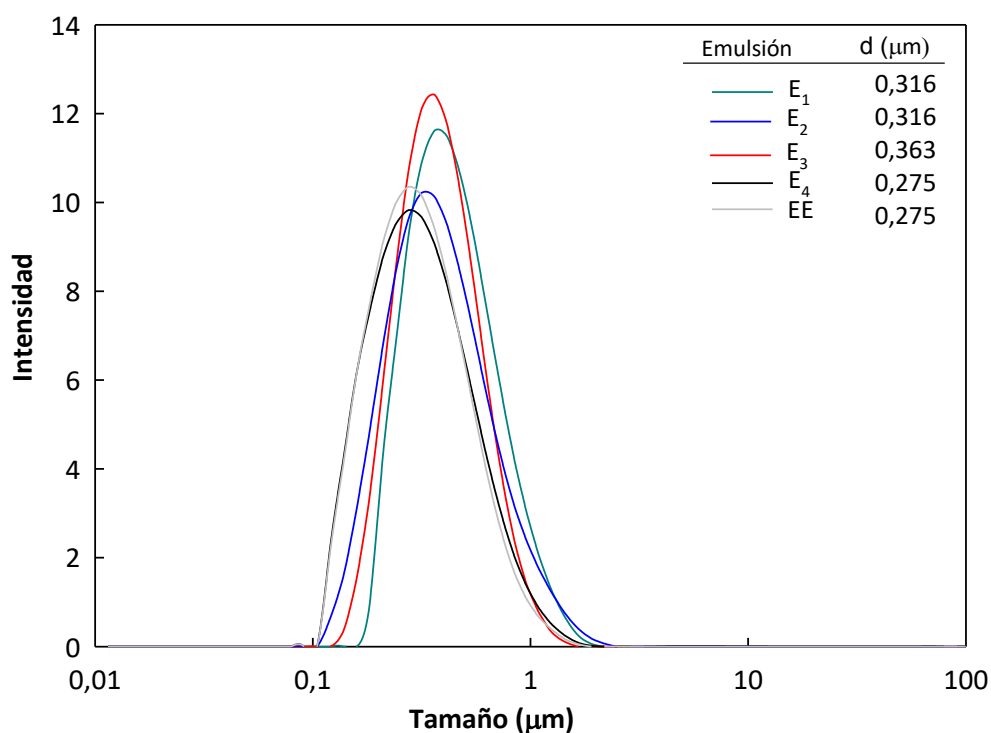


Figura 4.9. Tamaño de partícula de las emulsiones formuladas.

Las imágenes registradas mediante el uso de TEM confirmaron los resultados obtenidos previamente por otros métodos, mostrando tamaños de en el rango de 275-370 nm (Figura 4.10).

En todas las imágenes se puede ver la presencia de una capa de SDS, tal cual lo descripto por Chatterje y col. (2014). Por último, es necesario destacar en la Figura 4.11 los cambios experimentados por la emulsión después del entrecruzamiento con citrato confirmando el proceso de reticulación por el tratamiento con el anión.

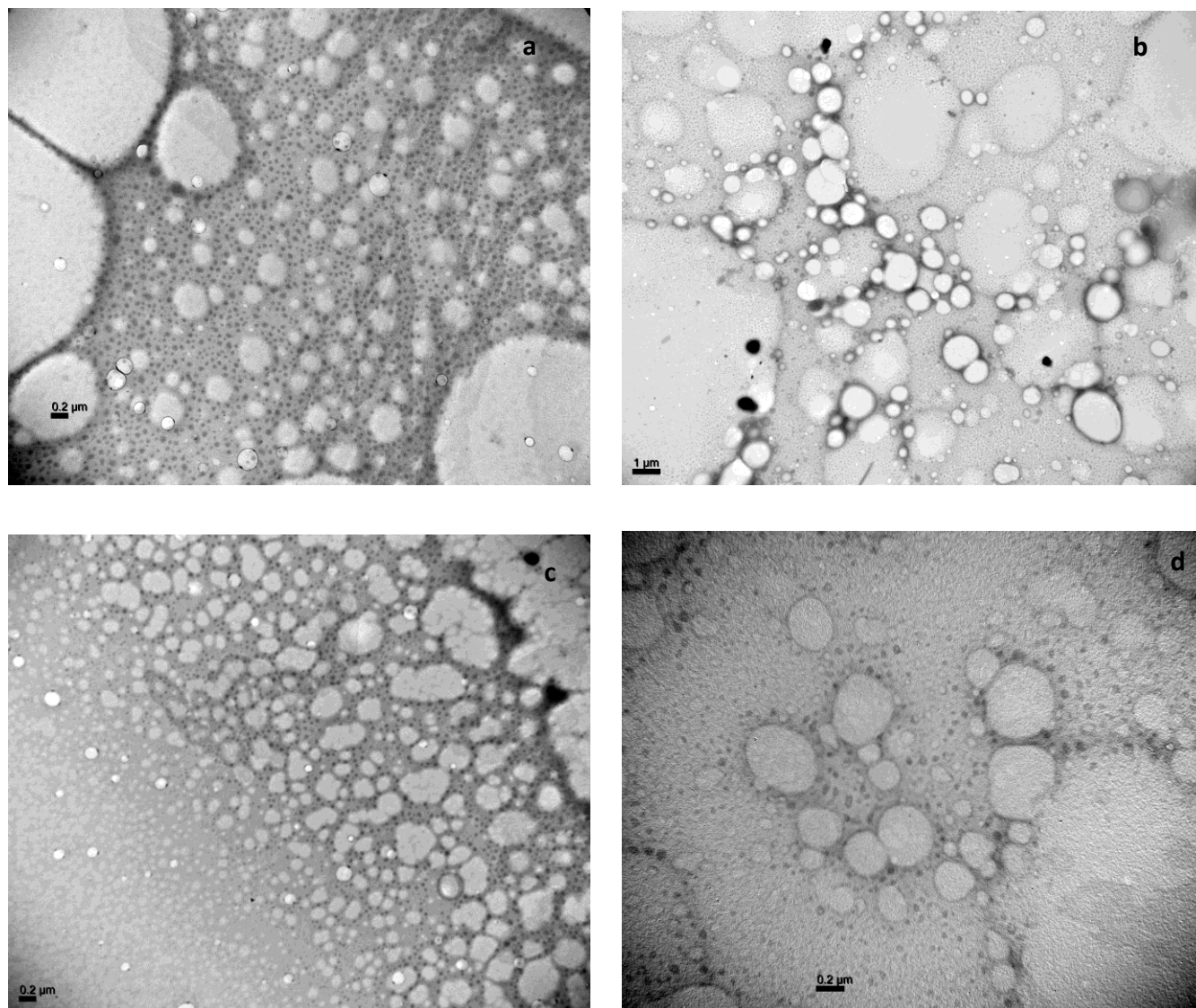


Figura 4.10. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las distintas emulsiones: **a)** E₁ (SDS 0,5 g l⁻¹); **b)** E₂ (Q/SDS 0,5 g l⁻¹); **c)** E₃ (SDS 1 g l⁻¹) y **d)** E₄ (Q/SDS 1 g l⁻¹).

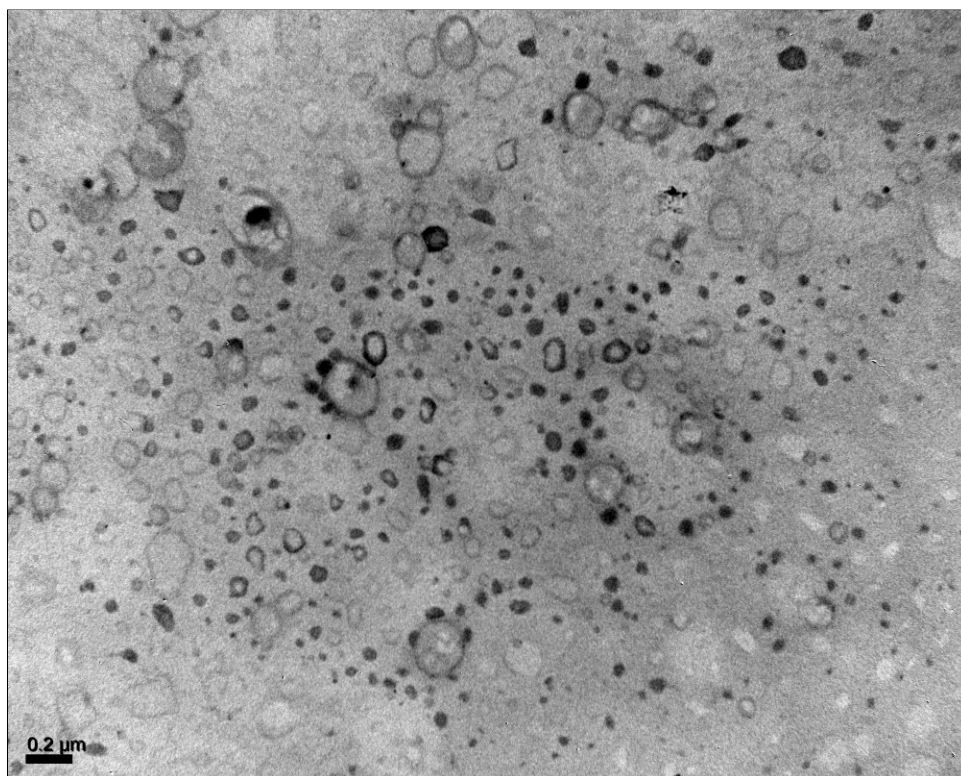


Figura 4.11. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la emulsión E_4 (Q/SDS 1 g l^{-1}) entrecruzada con CT.

En virtud de estos resultados, se propuso utilizar la emulsión entrecruzada con mayor estabilidad. Por lo tanto, la emulsión seleccionada para desarrollar las correspondientes películas, fue la formulada con una concentración de surfactante de 1 g l^{-1} .

4.4.3 Caracterización de los apósitos desarrollados

4.4.3.1 Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla 4.5 se resumen las propiedades fisicoquímicas de las películas compuestas formuladas.

Tabla 4.5. Propiedades fisicoquímicas de las distintas películas compuestas

Muestra	Humedad (%)	WVP $\times 10^{11}$ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	PO ₂ $\times 10^{15}$ (cm ³ m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	Hinchamiento (%)
PVA	13,7(0,9) ^c	0,94(0,025) ^a	2,4 (0,1) ^a	-
EE _A - PVA 2:3	6,4 (0,9) ^a	4,7(0,07) ^c	78,1 (6,3) ^c	315(13) ^c
EE _A -PVA- 1:1	10,1 (0,3) ^b	3,2(0,07) ^c	80,0 (4,8) ^c	133(6) ^b
EE _A - PVA 3:2	14,0 (0,2) ^c	1,07(0,06) ^b	73,3 (2,3) ^c	111(4) ^a
EE _B -PVA 1:1	10,2 (0,1) ^b	3,9(0,05) ^c	61,5 (4,2) ^b	135(8) ^b

EE_A: emulsión entrecruzada con citrato sódico al 0,125% p/v

EE_B: emulsión entrecruzada con citrato sódico al 0,250% p/v

PVA: 1% p/V

Teniendo en cuenta que los materiales desarrollados se utilizarán en aplicaciones dérmicas, el contenido de humedad es un parámetro relevante para evaluar su capacidad para generar un ambiente propicio para el tratamiento de problemas asociados con la cicatrización de heridas en la piel (Zhang y col., 2015). La película de PVA presentó un contenido de humedad bajo, similar al informado por Ramaraj y col. (2006) mientras que las matrices compuestas que contenían emulsiones en bajas proporciones generaron una disminución en el contenido de humedad ($p < 0,05$) con respecto a la del PVA, en tanto que el agregado de mayores proporciones de emulsión provocó un aumento.

El agregado de las emulsiones entrecruzadas produjo una ($p < 0,05$) disminución significativa en el hinchamiento de la matrices compuestas observándose una tendencia decreciente con el aumento de la relación EE:PVA (Tabla 4.5). Existen distintas razones por las cuales se estaría produciendo este fenómeno. La primera estaría relacionada con el contenido de aceite esencial presente en la matriz, lo cual genera una disminución en el valor de hinchamiento producto de su hidrofobicidad (Kavoosi y col., 2014). La segunda razón podría atribuirse a la existencia de interacciones entre el aceite y el PVA, que lleva a la saturación de los canales del polímero con el aceite con la consecuente disminución del hinchamiento de la matriz (Ramaraj y col., 2006). La última razón sería explicada por la

presencia de nanosistemas en la matriz polimérica que generaría un efecto de refuerzo restringiendo la transferencia de agua. Un hecho similar fue observado por Niazi y col, (2017), quienes reforzaron membranas de PVA con celulosa fosforilada evidenciando una disminución en el hinchamiento con el agregado de una fase de refuerzo.

Asimismo, la WVP del PVA presentó un valor bajo en comparación con las películas compuestas, esta propiedad fue correlacionado por Villarruel y col. (2015) con el grado de cristalinidad del polímero.




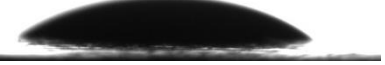

El agregado de emulsiones a la matriz de PVA provocó un aumento significativo de WVP ($p < 0,05$) con respecto al valor del PVA. Este fenómeno representa una ventaja en aplicaciones transdérmicas ya que un aumento en la transferencia de agua genera condiciones favorables para que se realice el proceso de angiogénesis (Andreu y col., 2015). Resultados similares fueron informados por Jiang y col. (2012), quienes trabajaron con películas de PVA a las cuales se les adicionó un complejo de inclusión a base de ciclodextrinas y clavo de olor. Los autores observaron que al aumentar el contenido de complejo aumentaba la permeabilidad al vapor de agua, asignándolo a la existencia de gran cantidad de grupos hidrofílicos capaces de interactuar con moléculas de agua. Sin embargo la incorporación de proporciones crecientes de emulsión a este sistema compuesto generó una disminución en la WVP para las formulaciones de la serie EE_A-PVA.

En el caso de las matrices compuestas EE-PVA, la presencia de quitosano y por ende de carga superficial positiva, aportó hidrofiliidad al medio. Adicionalmente Kavoosi y col. (2017) observaron un aumento en la WVP de películas de PVA con el aumento de contenido de aceite esencial de multiflora. Como consecuencia de las interacciones entre el aceite y el polímero se genera una disminución de las interacciones entre el PVA y el agua, con el consecuente aumento en la transferencia de agua. Asimismo, las películas mostraron valores de permeabilidad al oxígeno del orden de $270 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$. La permeabilidad al oxígeno también es una característica importante para favorecer el proceso de angiogénesis (Andreu y col., 2015). Como se puede ver en la Tabla 4.5, el valor más bajo corresponde al de la película de PVA. Abdulah y col. (2017) indicaron que valores bajos de permeabilidad al

oxígeno de matrices de PVA son producto de su cristalinidad explicando que las zonas cristalinas generan una resistencia a la difusión de moléculas respecto a las zonas amorfas. También explicaron que esta reducción en la permeabilidad se produce por la fuerte interacción entre las cadenas poliméricas. El agregado de emulsiones a las matrices de PVA generó un aumento en la permeabilidad, probablemente por los cambios morfológicos que experimenta la matriz con la inclusión de la emulsión entrecruzada en la matriz polimérica.

En la Tabla 4.6 se resumen los resultados de ángulo de contacto de las distintas películas ensayadas.

Tabla 4.6. Valores de ángulo de contacto de las distintas películas ensayadas

Muestra	Ángulo de contacto (°)	Imagen
PVA	34 (4) ^b	
EE_A-PVA 2:3	34 (4) ^b	
EE_A-PVA 1:1	40 (0,5) ^c	
EE_A-PVA 3:2	30 (5) ^b	
EE_B- PVA 1:1	18 (2) ^a	

*Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Los valores del ángulo de contacto para las películas de PVA se correlacionaron con una superficie hidrofílica, atribuida a la presencia de grupos -OH en su estructura tal como se describió previamente en el *Capítulo 3*. La incorporación de emulsiones entrecruzadas en menor proporción no generó una diferencia significativa en la hidrofiliidad del material, en tanto que la inclusión de una mayor proporción condujo a un aumento en los valores de ángulo de contacto. Asimismo, el agregado de la mayor concentración de citrato (0,250 % p/V) provocó un aumento en la hidrofiliidad de la superficie a pesar del menor grado de hinchamiento. Esto podría relacionarse a la presencia de un exceso de citrato que proporciona una mayor cantidad de sitios hidrofílicos disponibles para interactuar con las moléculas de agua en la superficie del material.

4.4.3.2 ATR-FTIR

El PVA presentó una banda en la región comprendida entre 3600 y 3000 cm^{-1} característica del estiramiento de los grupos -OH del polímero (Bonilla y col., 2014; Naduparambath, 2018; Villarruel y col., 2015). Las bandas de absorción localizadas a 2942 y 2900 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones de tensión C-H de la cadena alifática (Bonilla y col., 2014). El pico agudo localizado a 1715 cm^{-1} corresponde al estiramiento del C=O del grupo acetato (Figura 4.12).

Con la incorporación de emulsiones en distintas proporciones, la Figura 4.13 a muestra un cambio en la región ubicada entre 3600 y 3000 cm^{-1} . Se observó una disminución en la intensidad de esta banda de absorción atribuida por Bonilla y col. (2014) a una interacción entre el quitosano y el alcohol polivinílico. Asimismo, se produjo un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda en matrices compuestas (Figura 4.13 a).

Asimismo, las señales localizadas en la región 3000-2600 cm^{-1} experimentaron modificaciones en las películas compuestas. Las bandas correspondientes a esa región presentaron una alta coincidencia con la del aceite esencial de cabreuva, probablemente debido a su presencia en la superficie de la película.

En la región espectral donde se identifica el modo vibracional de las cadenas alifáticas del polímero se observó la aparición de un pico a 2964 cm^{-1} , coincidente con el espectro del cabreuva corroborando la presencia del compuesto activo en la película. Por otra parte, la banda localizada a 1147 cm^{-1} asociada a la cristalinidad del polímero se modificó con el ensamblado de las emulsiones entrecruzadas (Figura 4.13 b). Estos resultados sugieren que la formulación de sistemas combinados PVA-emulsión entrecruzada indujeron cambios estructurales asociados a la cristalinidad del PVA.

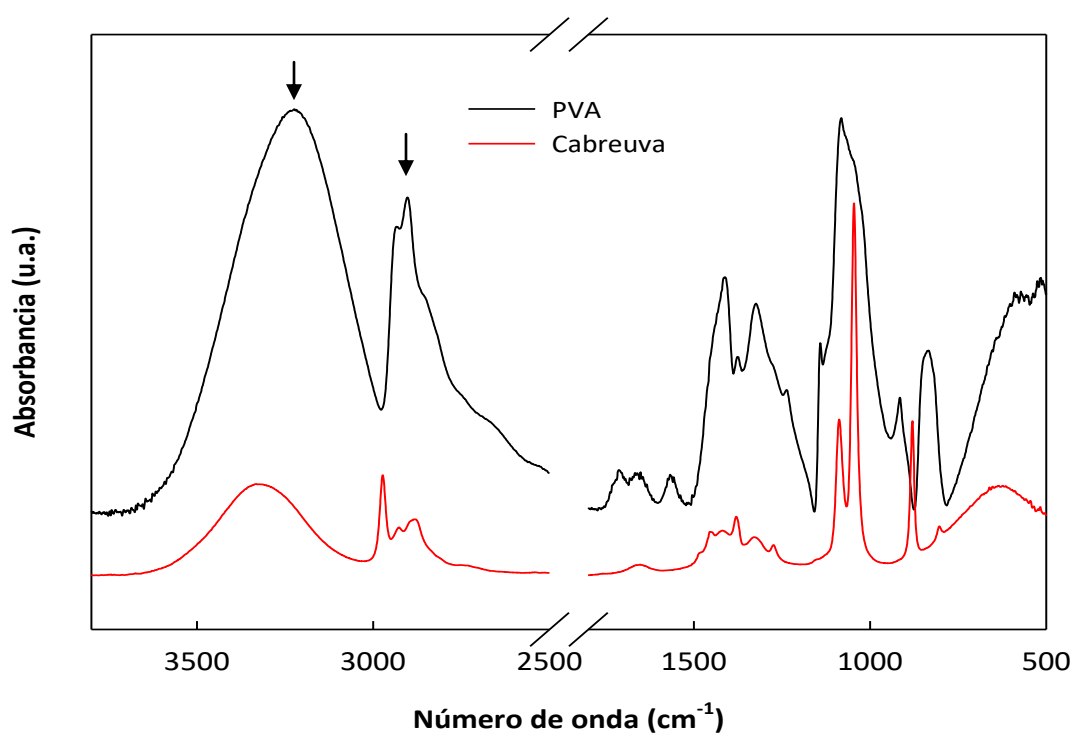


Figura 4.12. Espectros ATR-FTIR de las películas de PVA y del aceite esencial de cabreuva usado como componente activo.

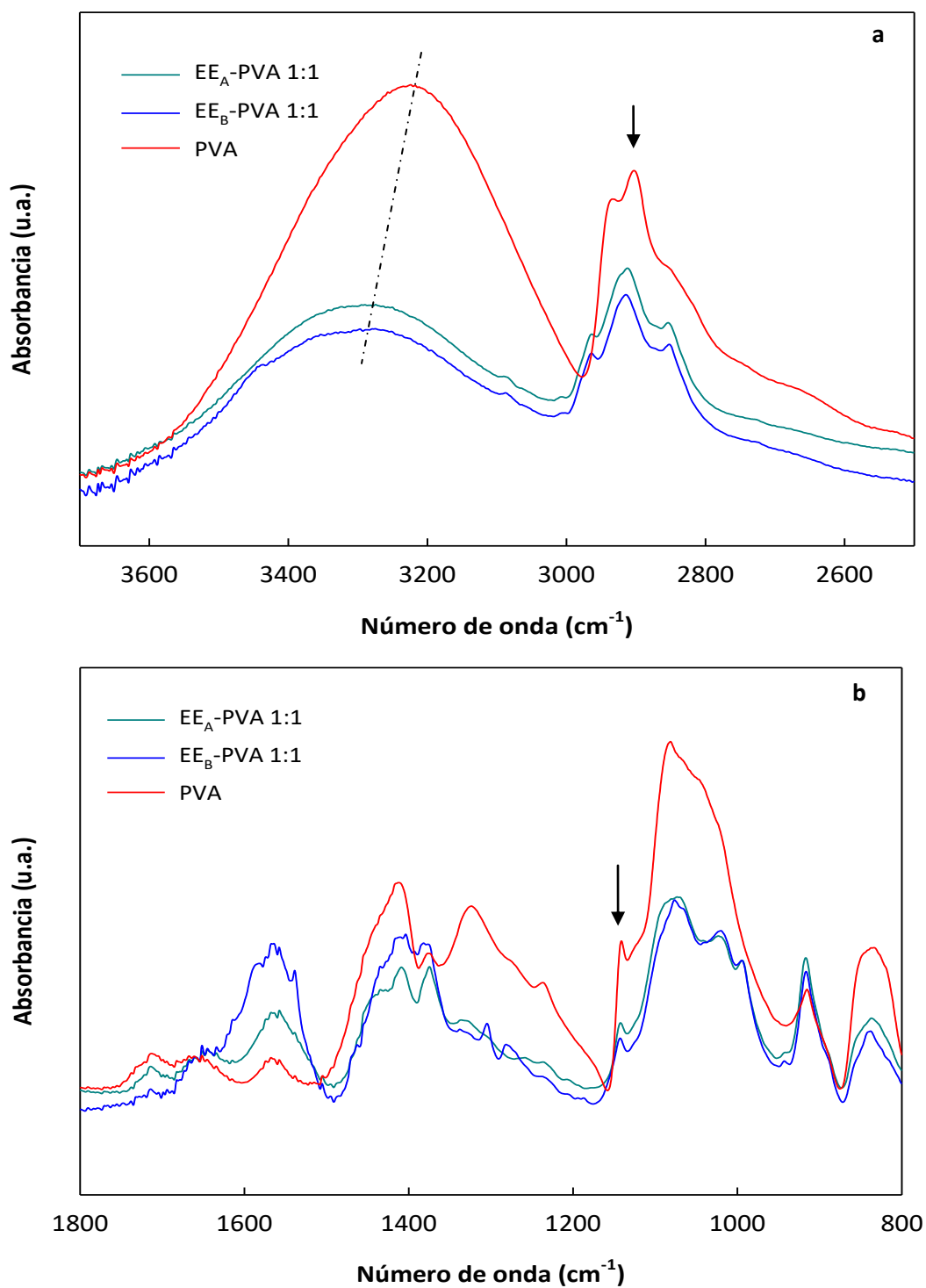


Figura 4.13. Espectros ATR-FTIR de las películas de PVA y las matrices compuestas de PVA y emulsiones entrecruzadas (EE_A-PVA y EE_B-PVA 1:1) en la región espectral comprendida entre: **a)** 3600-2600 cm⁻¹ y **b)** 1800-800 cm⁻¹.

4.4.3.3 Propiedades mecánicas

En la Tabla 4.7 se resumen los parámetros obtenidos a partir de los perfiles mecánicos de las distintas películas,

Tabla 4.7. Propiedades mecánicas de las distintas películas formuladas

Muestra	Relación EE _{A,B} -PVA	Esfuerzo (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Tenacidad (J)
PVA	0:1	27,0(1,5) ^{b*}	144,5(3),0 ^d	0,44(0,05) ^d
EE _A - PVA	2:3	5,9(0,8) ^a	43,3(4,4) ^c	0,046(0,007) ^c
	1:1	6,2(0,7) ^a	22,1(2,9) ^a	0,022(0,006) ^a
	3:2	5,3(0,7) ^a	21,0(2,9) ^a	0,019(0,005) ^a
EE _B -PVA	1:1	5,3(0,7) ^a	27,8(2,2) ^b	0,016(0,002) ^a

*Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras.

EE_A: emulsión entrecruzada con citrato sódico al 0,125% p/v

EE_B: emulsión entrecruzada con citrato sódico al 0,250% p/v

Se obtuvo un valor de esfuerzo para la matriz de PVA de 27 MPa (Tabla 4.7), similar al observado por Niazi y col. (2017) para películas de PVA. Se evidenció que la inclusión de la emulsión entrecruzada generó una disminución significativa ($p < 0,05$) de los valores de esfuerzo y elongación en comparación con las películas de PVA. Estos resultados podrían explicarse considerando la posible interrupción de las interacciones de las cadenas de PVA debido a la incorporación de la emulsión y a la consecuente re-asociación de segmentos, pudiéndose generar así nuevas interacciones entre la emulsión y los grupos funcionales del PVA (Kavoosi y col., 2017),

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras compuestas formuladas con proporciones de emulsión mayores que 1:1. Niazi y col. (2017) obtuvieron resultados similares en matrices de PVA reforzadas con una fase dispersa de nanocelulosa. Los autores atribuyeron este efecto a la generación de pequeñas grietas o

puntos débiles en la estructura del biopolímero lo cual genera fallas en el material con la consecuente disminución en el valor de esfuerzo.

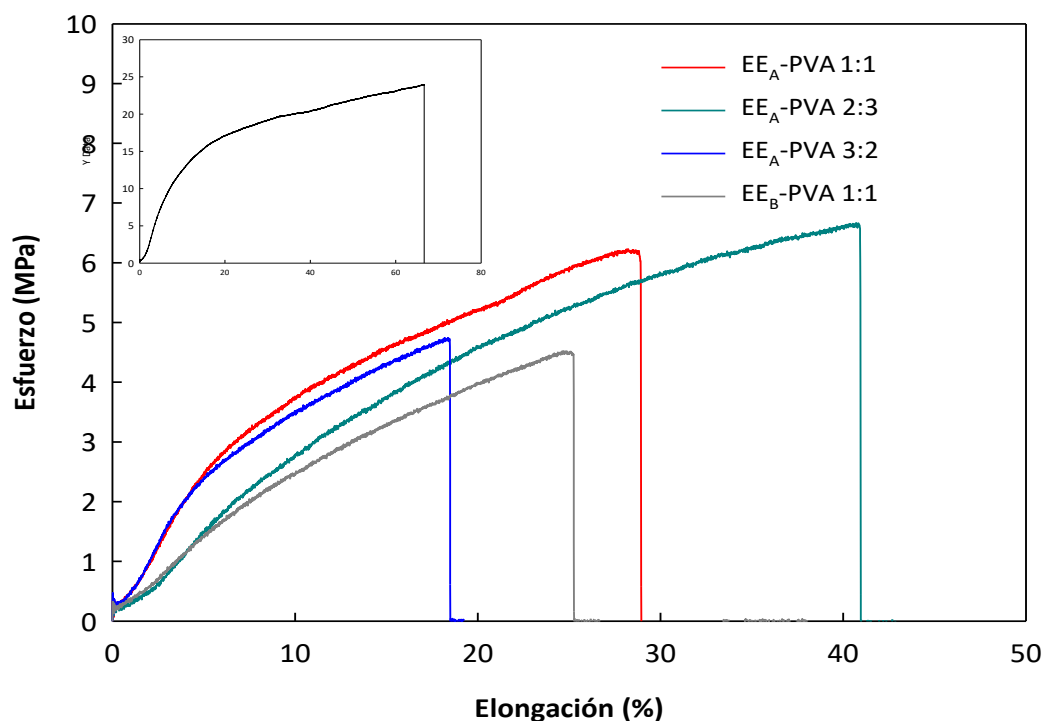


Figura 4.14. Perfiles mecánicos de las películas compuestas con emulsiones. El inserto muestra el perfil de la película de PVA.

Se observaron diferencias significativas en los valores de elongación ($p < 0,05$) de las matrices EE_{A,B}-PVA (Figura 4.14). Este comportamiento podría atribuirse a la generación de una estructura con un ordenamiento al azar resultando en un arreglo que falla con una menor deformación. Este resultado fue similar al informado por Jiang y col. (2012) quienes observaron el mismo fenómeno con la inclusión de concentraciones crecientes de complejos de aceite de clavo y ciclodextrinas. Los autores atribuyeron este efecto a una dispersión uniforme del complejo en la matriz polimérica, sugiriendo que una cantidad excesiva ocasionaría una incompatibilidad entre las fases. Por otra parte, el valor de elongación para la película PVA EE_A 2:3 fue mayor exhibiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación a

las matrices formuladas con proporciones crecientes de emulsión (Figura 4.14). Una tendencia similar fue encontrada por Hu y col. (2017) quienes reforzaron matrices de PVA con partículas de óxido de grafeno. Los autores encontraron que al superar una concentración crítica de fase dispersa se genera una sobrecarga en la matriz, interrumpiendo la continuidad de las cadenas de PVA y una disminución en la tenacidad de las matrices poliméricas. Esta hipótesis explicaría los resultados obtenidos en relación a la tenacidad del material (Tabla 4.7).

4.4.3.4 Análisis térmico y microestructural

Para evaluar la cristalinidad de las matrices se emplearon dos técnicas, DSC y DRX. Un factor importante de los aceites esenciales es la volatilidad. El conocimiento de esta propiedad permite dilucidar la velocidad con la que se evaporan los componentes presentes en el AE cuando son expuestos al aire. Teniendo en cuenta esta premisa, el análisis térmico a través del TGA y DSC permite un estudio en relación a la volatilidad de los compuestos del AE.

En este sentido, el análisis térmico por DSC del aceite esencial de cabreuva reveló (Figura 4.15a) un evento endotérmico con una temperatura de inicio a 155°C correspondiente a la temperatura de ebullición del AE y una temperatura de pico alrededor de 170°C adscripta a la temperatura de evaporación con una entalpía asociada de 52,91 J g⁻¹.

Los termogramas de películas de PVA corresponden al primero y segundo barrido de temperaturas en la etapa de calentamiento. El segundo barrido permite borrar la historia térmica del material para eliminar interferencias que pudieran afectar el valor de entalpía y la ubicación de la temperatura de transición vítrea. La temperatura de transición vítrea del PVA fue identificada a 75,6°C (Figura 4.15a). En bibliografía se han informado valores de T_g en el rango de 58 y 85°C, atribuyendo las diferencias observadas a la dependencia de factores inherentes tales como grado de hidrólisis y grado de polimerización (Naduparambathy col., 2018).

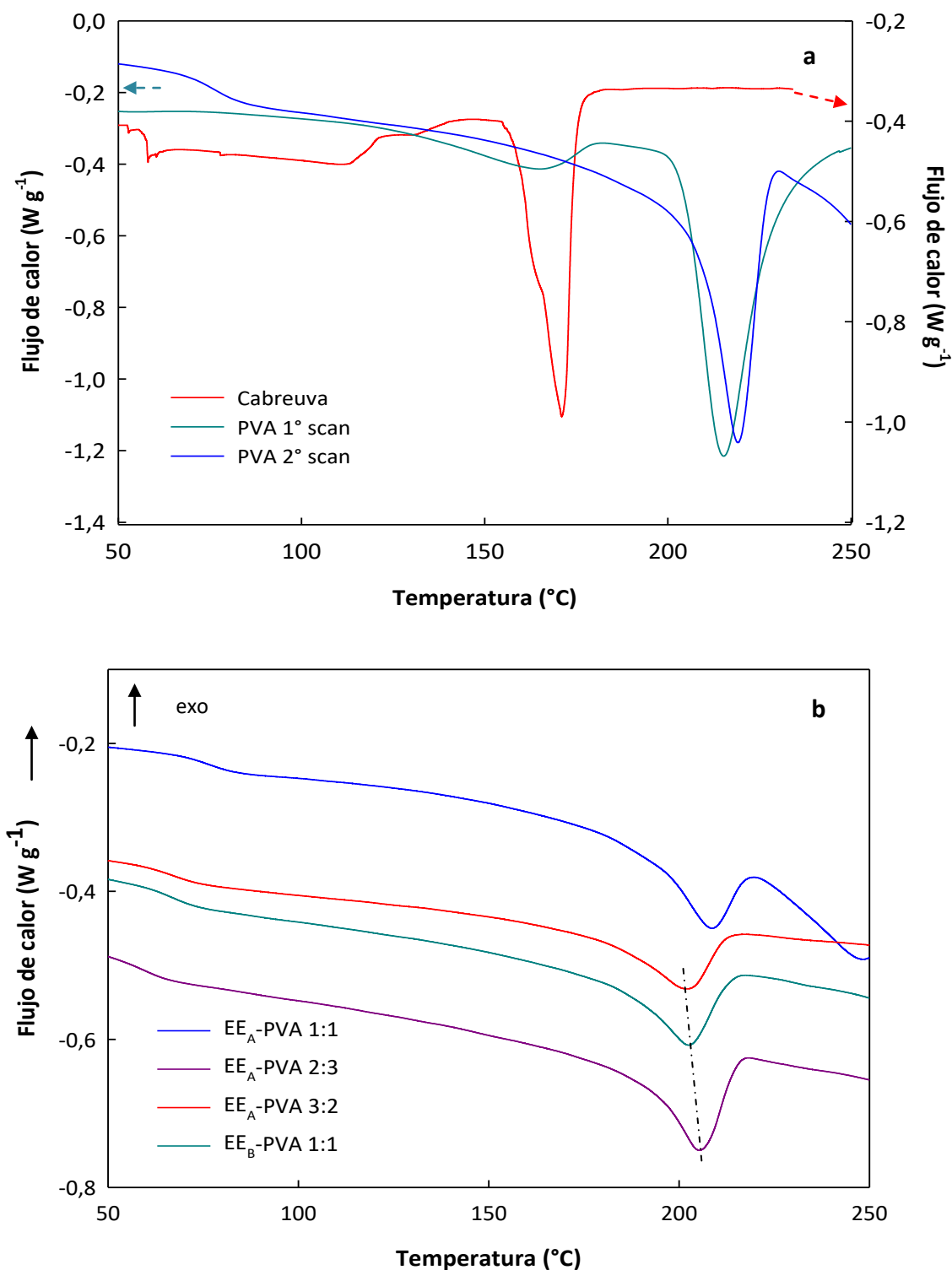


Figura 4.15. a) Termogramas de AE de cabreuva y PVA correspondiente al primero y segundo barrido de calentamiento obtenidos mediante la técnica de DSC; **b)** termogramas correspondientes al segundo barrido de calentamiento de las muestras compuestas.

En la Figura 4.15 a se observa un evento endotérmico asociado a la fusión de la fase cristalina del PVA (Lewandowska, 2009). Mientras tanto, la entalpía del pico endotérmico correspondiente a la fusión de la fase cristalina se hizo menos prominente en las matrices compuestas (Figura 4.15 b). Kubo y col. (2003) y Guirguis y Moselhey (2012) señalaron que la disminución en la entalpía de fusión se correlaciona con la reducción en la perfección de la estructura de los cristales y por ende con el grado de cristalinidad en las matrices compuestas.

En la Tabla 4.8 se pueden apreciar los valores de entalpías asociados a esta transición endotérmica indicando que la incorporación de las emulsiones entrecruzadas generó una disminución significativa ($p < 0,05$) de este parámetro.

Tabla 4.8. Transiciones térmicas obtenidas por DSC modulado.

Muestra	ΔH_p (J g ⁻¹)	X _c (%)	T _g (°C)	ΔH_c (J g ⁻¹)
PVA	48 (2) ^c	30 (1) ^b	76 (0,9) ^a	62,0 (1) ^c
EE _A -PVA 2:3	11,7 (0,9) ^b	11 (4) ^a	77 (2,9) ^a	28,0 (9) ^b
EE _A -PVA 1:1	17,0 (2) ^b	7,2 (0,5) ^a	72 (4,1) ^a	24,3 (0,4) ^b
EE _A -PVA 3:2	9,2 (0,2) ^{a,b}	5,7 (0,2) ^a	77 (0,7) ^a	9,6 (0,6) ^a
EE _B -PVA 1:1	10,9 (1,5) ^a	6 (1) ^a	73 (1,1) ^a	23,0 (3) ^b

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$)

No se observaron diferencias significativas en relación a la T_g de los materiales ensayados. Lipatov y Alekseeva (2007) remarcaron que es posible observar separación de fases de un sistema mediante la técnica de DSC mientras que Abdelrazek y col., (2010) y Olabisi y col. (1979) aseveraron que la aparición de una T_g sustentaría la hipótesis de la existencia de compatibilidad entre las fases que forman parte del sistema. Estos autores estudiaron este

fenómeno en matrices compuestas de PVA y polivinilpirrolidona (PVP) reforzadas con relleno de quitosano.

A partir del análisis en la etapa de enfriamiento, en los termogramas se observó un evento exotérmico asociado a la temperatura de cristalización del PVA. La inclusión de emulsiones en la matriz de PVA modificó significativamente ($p < 0,05$) el valor de la entalpía de cristalización. También se evidenció una disminución en el grado de cristalinidad del polímero lo cual indica nuevamente una buena compatibilidad entre los componentes (Bonilla y col., 2014). Un cambio en la cristalinidad del material puede ser debido a interacciones polímero-polímero en la fase amorfa induciendo así un desorden en los cristales de PVA generando un cambio en la entalpía de fase (Villaruel y col., 2015)

Desde el punto de vista térmico, otro aspecto a resaltar relacionado con la presencia del AE en las matrices, es la no distinción de transiciones asociadas a la vaporización del aceite esencial, lo cual indicaría que el mismo se encuentra encapsulado luego del entrecruzamiento de la emulsión con CT y protegido en la matriz soporte de PVA (Figura 4.15 a) (Ferreira y col., 2016).

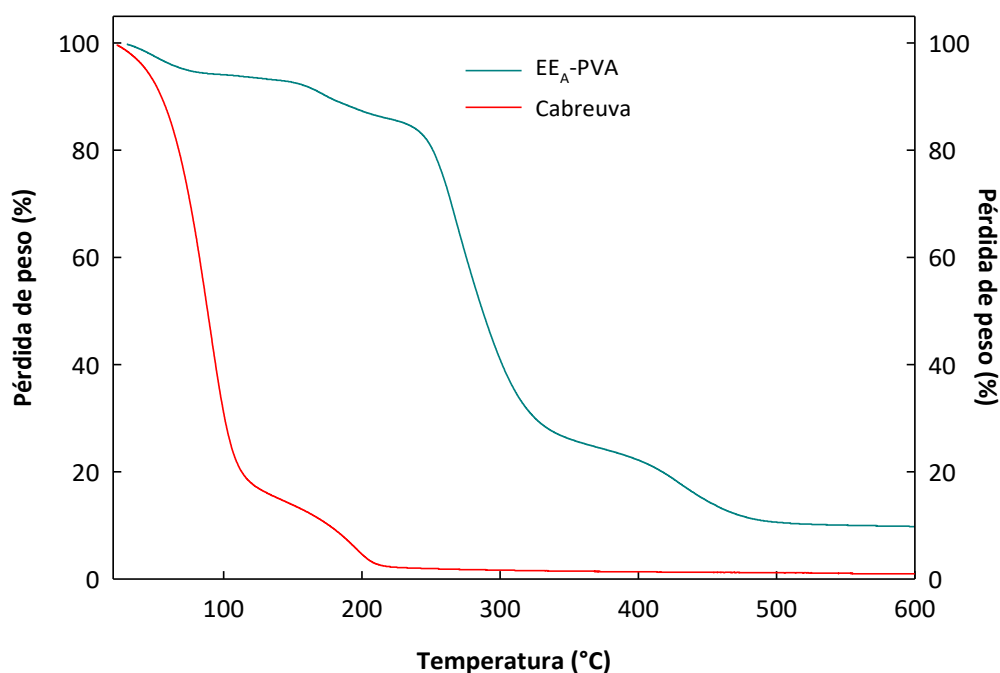


Figura 4.16. Curvas de análisis termogravimétrico de distintas muestras ensayadas: EE_A-PVA y aceite esencial de cabreuva (AE).

La Figura 4.16 muestra los termogramas obtenidos por TGA del aceite esencial de cabreuva y el apósito EE_A-PVA. En el caso del apósito se trata de una muestra compleja con gran número de componentes, PVA, Q, SDS, CT y cabreuva, entre otros.

El PVA con la emulsión entrecruzada se degrada en tres etapas. La primera ocurre antes de los 200°C, la segunda entre los 280°C y los 350°C, y la tercera entre los 350°C y los 477°C. La primera etapa de degradación se debe a la evaporación de agua unida y adsorbida en la estructura dado que es un polímero hidrofílico y probablemente en parte a la vaporización del AE. La segunda etapa incluye la descomposición de las cadenas por deshidratación del polímero acompañada por la formación de productos volátiles y polímeros insaturados (residuos). En la tercera etapa, el residuo polimérico es degradado (Carlo y Habert, 2018). Las pérdidas de peso correspondiente a la etapa de mayor caída, comprendida entre 280-350°C, fue de 60,4%

Las etapas observadas para el análisis termogravimétrico del aceite esencial de cabreuva se correspondieron con lo analizado por DSC con dos etapas de pérdida de masa. En la primera etapa, entre 25 y 120 °C, se produjo una pérdida del 80,7% de la masa y en la segunda, entre 120 y 270°C el 17,3% restante.

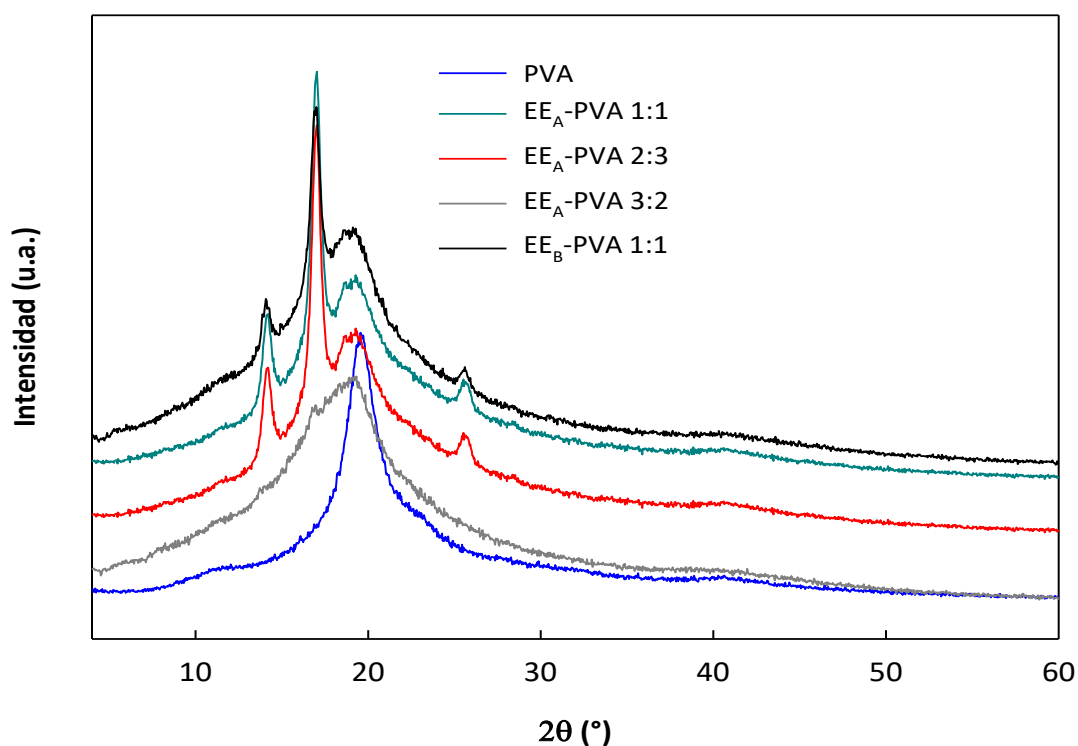


Figura 4.17. Difractogramas de las distintas muestras ensayadas. EE_A : emulsión entrecruzada con citrato de sodio (CT) 0,125% p/v y EE_B emulsión entrecruzada con CT 0,250 % p/v.

La Figura 4.17 muestra los patrones de difracción obtenidos de películas de PVA y matrices compuestas. El difractograma del PVA exhibió un pico cercano a 19° (2θ) asociado al plano (101) de la estructura semicristalina del PVA debido a las fuertes interacciones de tipo puente de hidrógeno establecidas entre las cadenas poliméricas (Hong, 2016). Similares resultados fueron informados por Sheik y col, (2017). El agregado de las emulsiones generó una disminución del tamaño lo que sugiere una fuerte interacción entre la matriz soporte de

PVA y los componentes presentes en la emulsión. Este resultado está de acuerdo con lo obtenido por DSC, en donde la reducción de la cristalinidad se relacionó con una significativa disminución ($p < 0,05$) en el calor de fusión de la fase cristalina del PVA. También se puede destacar la modificación de la posición del pico asociada a la reflexión del plano (101) del PVA con el ensamblado de emulsiones. Bisen y col. (2017) indicaron que una modificación en la posición de este pico se correlaciona con una modificación en el espaciado entre los respectivos planos cristalinos. Li y col. (2015) señalaron que el corrimiento del pico podría relacionarse con las interacciones presentes entre el PVA y el quitosano. Asimismo, los autores plantearon que la inexistencia de interacciones entre los polímeros se traduciría en la separación y/o aparición de picos de difracción de DRX característicos de cada uno de los componentes. Por otro lado, no se identificaron nuevos picos en los difractogramas de las películas compuestas. En este sentido, Nisar y col, (2018) observaron un resultado similar al trabajar con películas de pectina modificadas con aceite esencial de clavo de olor. Los autores postularon que la inexistencia de nuevos picos en los difractogramas se debe a que no existen interacciones químicas entre la matriz y el aceite.

5.4.3.5 Análisis por microscopía electrónica

Las películas de PVA mostraron un aspecto homogéneo con una estructura compacta con buena integridad estructural (Figura 4.18 a). Las micrografías de las películas funcionalizadas con AE, mostraron que la inclusión de las emulsiones entrecruzadas en un soporte de PVA generó matrices con una estructura rugosa, identificando la presencia de poros o cavidades distribuidos irregularmente a lo largo de la matriz (Figura 4.18 b-e). El arreglo estructural que adoptan los polímeros permite la formación de una red microestructural de aspecto granular. Asimismo, las micrografías exhibieron una mayor porosidad con el aumento de la proporción de emulsión en el sistema. Estas observaciones confirmaron los resultados relacionados con el comportamiento de las películas discutido en párrafos anteriores, tales como el aumento en la permeabilidad al vapor de agua, así como la disminución en la elongación.

Este resultado fue similar al observado por Nisar y col. (2018) quienes señalaron que al aumentar el contenido de aceite esencial de clavo en matrices de pectina se visualizó por SEM un mayor contenido de poros y un aumento en la rugosidad de las matrices. Estos autores atribuyeron este efecto a que el aumento en la concentración de aceite genera una migración y posterior floculación de las gotas de aceite inducido durante la etapa de secado. Estos procesos generarían la formación de dos fases con la concomitante aparición de irregularidades en la estructura de la matriz y la aparición de poros en la misma.

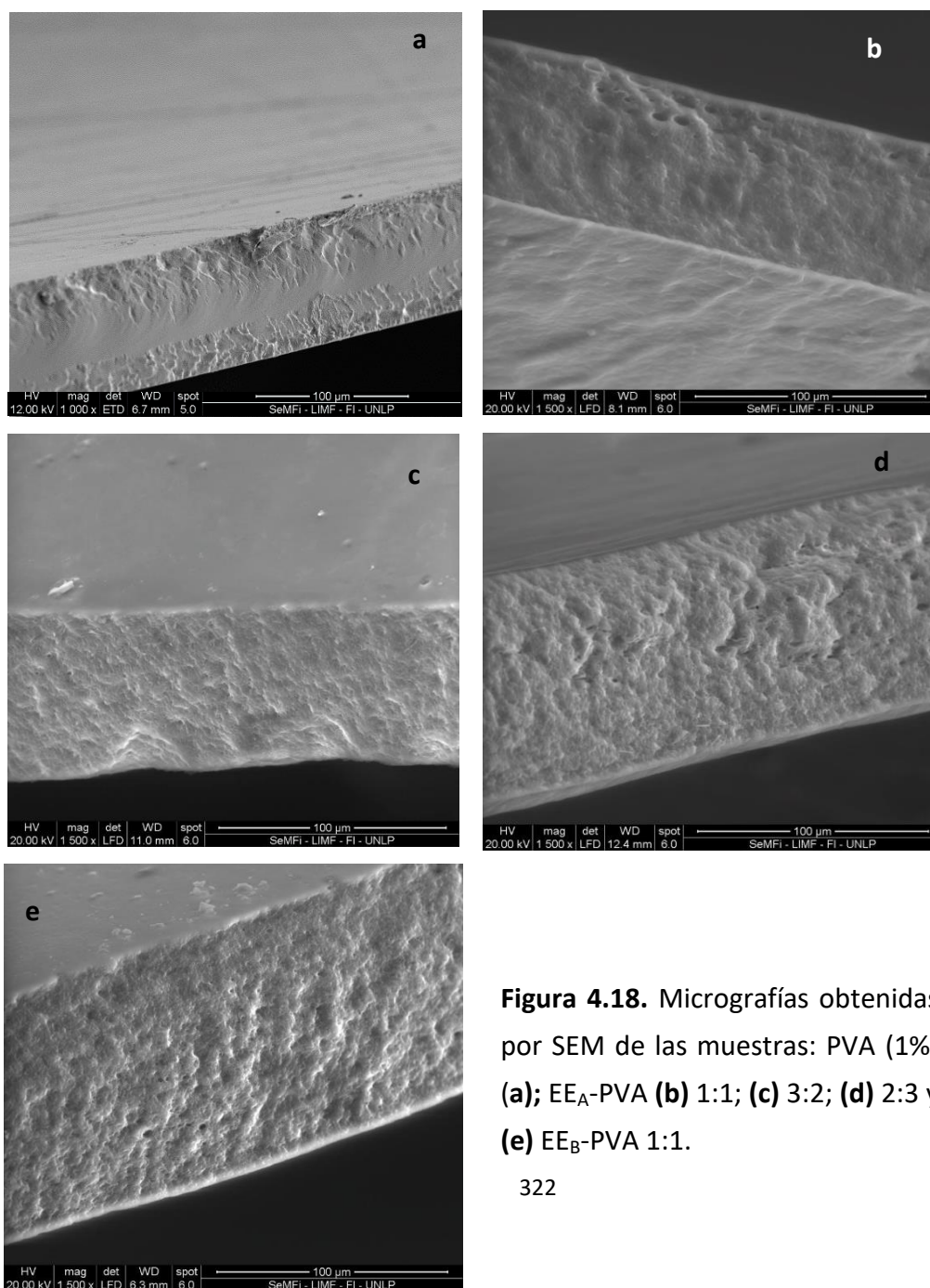


Figura 4.18. Micrografías obtenidas por SEM de las muestras: PVA (1%) (a); EE_A-PVA (b) 1:1; (c) 3:2; (d) 2:3 y (e) EE_B-PVA 1:1.

4.4.4 CMI del AE de cabreuva y capacidad antimicrobiana de los apósitos

Uno de los microorganismos más importantes en el estudio de tratamiento de pieles es el *Staphylococcus epidermidis*, microorganismo perteneciente al grupo *Staphylococcus* que tiende a colonizar la piel y la membrana de las mucosas, siendo el principal productor de infecciones nosocomiales. Las infecciones más comunes con este patógeno son las generadas por cuerpos extraños, debido a la capacidad del patógeno para formar *biofilms* (Voung y Otto., 2002).

Los estudios microbiológicos revelaron que la concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial de cabreuva fue de 0,05% frente a *Staphylococcus aureus* y 0,05 % para *Staphylococcus epidermidis* estimado a partir de la siembra en placa.

En forma complementaria los estudios de difusión en discos de papel confirmaron la capacidad antimicrobiana frente *S. aureus* y *S. epidermidis* de las distintas diluciones de aceite esencial. A partir de una concentración del 2,5% se visualizó la formación de un halo de inhibición el cual se intensificó con el aumento de la concentración de AE (Figura 4.19). Este resultado fue similar al encontrado por Tao y col. (2013) quienes aislaron nerolidol de levaduras de *Ginkobiloba* y observaron que este sesquiterpeno mostró una significativa actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. Estos autores indicaron que el nerolidol aumenta la sensibilidad de este patógeno a diversos antibióticos. En forma análoga, Brehm-Stecher y Johnson (2003) indicaron que este tipo de comportamiento se debe a que el compuesto activo posee la capacidad de disrupción de la membrana citoplasmática de las bacterias ya sean *Gram positivas* o *Gram negativas*.

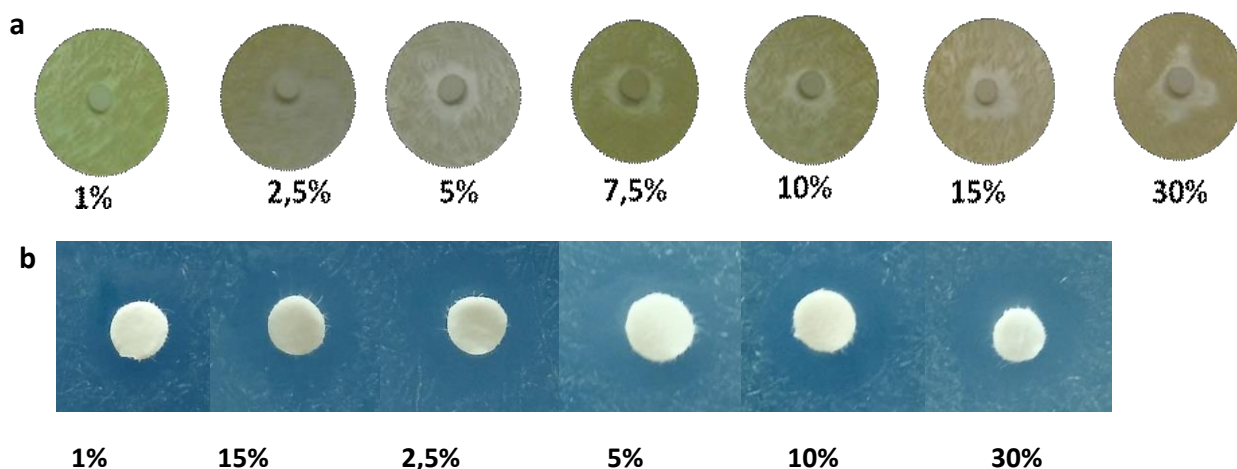


Figura 4.19. Fotografías de discos de papel impregnados con diluciones de aceite esencial frente a **a)** *Staphylococcus aureus* y **b)** *Staphylococcus epidermidis*.

Estos resultados podrían atribuirse a la capacidad antibacteriana del trans-nerolidol compuesto mayoritario en el aceite esencial de cabreuva. Cavar y col. (2008) indicaron que el aceite esencial de *Satureja* presentó capacidad antibacteriana frente *S. epidermidis*; los autores asignaron este efecto a la composición química del aceite esencial. El AE de *Satureja* es una mezcla de distintos terpenos y sesquiterpenos dentro de los cuales se encuentra el trans-nerolidol, confirmando su acción antimicrobiana.





Por otra parte, se llevaron a cabo determinaciones de actividad antimicrobiana de los apósitos funcionalizados con el AE. La película seleccionada para realizar los ensayos *ex vivo* e *in vivo* fue la formulación EE_A-PVA 1:1 debido a que se tomó en cuenta que la matriz fue capaz de encapsular una significativa proporción de emulsión (50%) sin detrimento de las propiedades mecánicas con respecto a la película con mayor contenido de PVA (EE_A-PVA 2:3). Asimismo las propiedades de barrera al agua resultaron superiores a la matriz compuesta con mayor proporción de emulsión (EE_A-PVA 3:2). Se estableció una relación de compromiso entre el contenido de emulsión funcionalizada con el AE y las propiedades de barrera, mecánicas, y la proyectada aplicación del apósito como dispositivo de liberación controlada.. Tomando en consideración que la formulación seleccionada se utilizará en aplicaciones

dérmicas, se estudió la capacidad antimicrobiana de la matriz frente al desarrollo de diferentes microorganismos *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Candida albicans*. En la Tabla 4.9 se resumen los resultados obtenidos y se observan las fotografías de los halos de inhibición correspondientes a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *Candida albicans*.

La capacidad antimicrobiana de la película EEA-PVA 1:1 desarrolladas se evaluó a través del método de difusión en agar. Para los casos de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* con una concentración de 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹, los apósitos inhibieron el desarrollo de los mismos demostrado por la formación de los halos correspondientes. Brehm-Stecher y Johnson (2003) encontraron que el nerolidol genera una sensibilización de diversos antibióticos frente a este patógeno.

En el caso de *Candida albicans* la inhibición del crecimiento sólo se observó en la región en contacto con el apósito. Es necesario destacar si bien la CMI es menor a la utilizada para formular los apósitos (3,75%) el aceite esencial se encuentra encapsulado e inmovilizado en la matriz del apósito tal como se demostró por técnicas como DSC y FTIR generando así solo inhibición por contacto.

Tabla 4.9. Porcentaje de inhibición de la película EE_A-PVA 1:1 frente a *E.coli*, *S.aureus*, *S.epidermidis* y *Candida albicans*

Patógeno	Halo de inhibición (cm)	Foto
<i>E. coli</i>	2,3 (0,9) ^a +	
<i>S. aureus</i>	2,1 (1,0) ^a +	
<i>S. epidermidis</i>	2,2 (0,8) ^a +	
<i>Candida albicans</i>	Inhibición por contacto -	

*

*Diferentes superíndices indican diferencia significativas entre muestras (p<0,05)

4.4.5 Estudios de aplicación in vivo del apósito

La Figura 4.20 muestra la fotografía del apósito obtenido y un esquema de la composición del mismo.

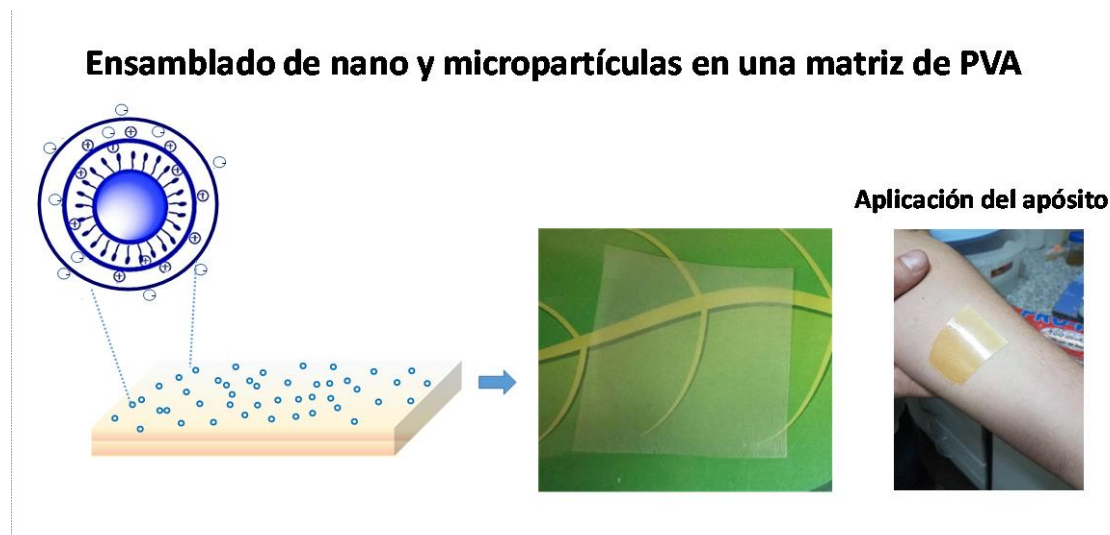


Figura 4.20. Esquema representativo de los apósitos utilizados como dispositivos de liberación controlada

En la Figura 4.20 se muestra a modo de ejemplo los espectros ATR-FTIR obtenidos de la piel del antebrazo de una persona y de la piel después de 1, 4 y 7 h de contacto con el apósito.

Se puede ver que existen variaciones en las bandas relacionadas a los modos vibracionales de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo CH_2 , estas variaciones se intensificaron después de un tiempo de contacto de 4 y 7 horas lo que indicaría una desorganización de los lípidos aumentando la fluidez de las membranas de las células en el estrato córneo (EC) debido a la presencia del aceite esencial en la piel (Liu y col., 2017).

La disminución en la intensidad de los picos puede también ser atribuido a este cambio conformacional de los lípidos presentes en el EC (Liu y col., 2017; Ibrahim y Li, 2010). Según Kontogiannidou y col. (2017) esta fracción de lípidos está fundamentalmente compuesta por

ceramidas y fosfolípidos, los cuales proporcionan información de la estructura interna del EC. Estos autores encontraron resultados análogos al tratar muestras de pieles con Farnesol.

También es adecuado destacar que los lípidos presentes en el EC tienen cargas negativas que pueden interactuar con las cargas positivas del quitosano aumentando el nivel de penetración del compuesto activo (Can y col., 2013). Asimismo, Can y col. (2013) informaron que el corrimiento de este modo vibracional se debe a interacciones entre los sesquiterpenos y los lípidos del EC, interrumpiendo así las interacciones de tipo puente de hidrógeno.

En la Figura 4.21 se puede observar una variación en los modos vibracionales pertenecientes a la amida I y II de las proteínas presentes en las muestras de piel, más específicamente al estiramiento de los grupos C=O y N-H, respectivamente (Kontogiannidou y col., 2017). Según Ibrahim y Li (2010) el corrimiento de la banda perteneciente a la amida I es debido a cambios en la conformación de las proteínas presentes en la piel. Estos autores también afirman que este cambio en las proteínas puede relacionarse con la modificación de la conformación de los lípidos del estrato córneo.

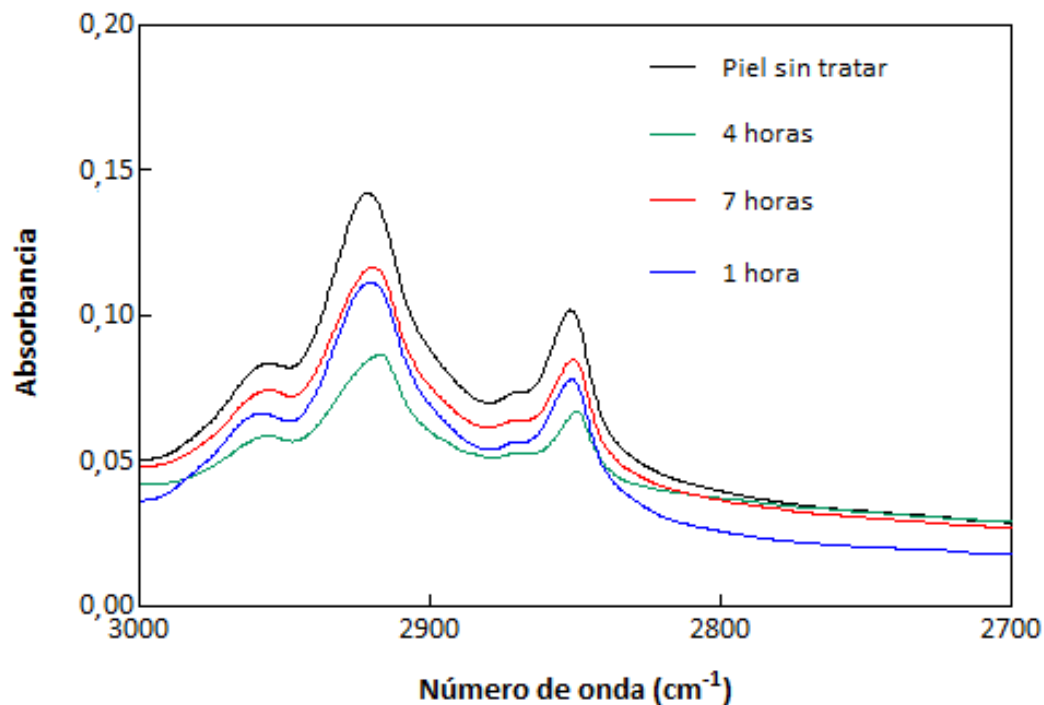


Figura 4.21. Espectros ATR-FTIR obtenidos de la piel del antebrazo de una persona sin tratamiento y de la piel después de 1, 4 y 7 h de contacto con el apósito.

4.4.6 Estudios de aplicación ex vivo del apósito.

4.4.6.1 Penetración de aceite esencial en el explanto

Como se mencionó previamente, para evaluar la penetración del aceite esencial en pieles se utilizó el diseño del sistema SPM; según Montanari y col, (2010) este dispositivo utilizado en condiciones no oclusivas permite mantener un gradiente de humedad alrededor de la piel, lo cual genera el transporte de los componentes activos a través de la misma. Estos autores afirmaron que al comparar el sistema SPM con una celda de difusión de Franz, el dispositivo SPM evita la hidratación no fisiológica y los cambios en la piel debido a la ausencia de líquido como medio receptor. Sumado a esto la utilización del dispositivo SPM asegura que la fluorescencia detectada se deba exclusivamente a la penetración del compuesto activo desde la parte superior de la piel hasta la profundidad de las capas inferiores de la epidermis y no a la penetración basolateral la cual es inherente a la celda de Franz (Wagner y col, 2000).

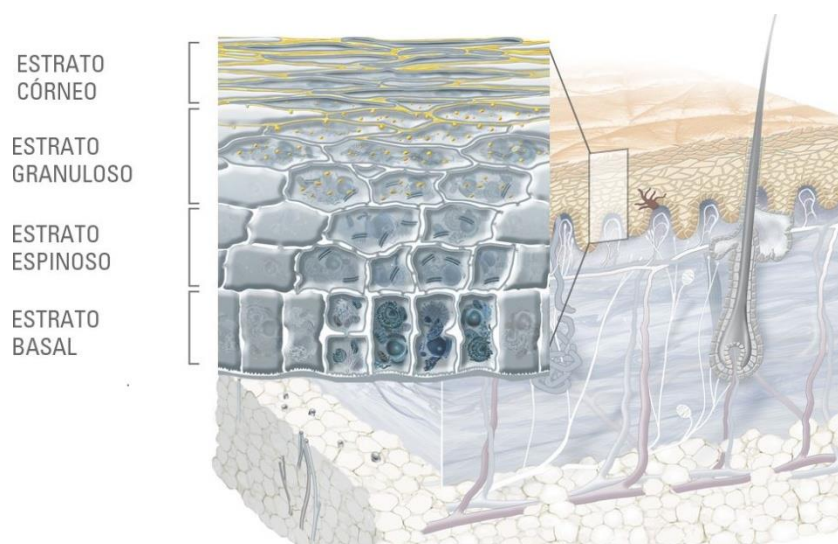


Figura 4.22. Esquema representativo de la estructura general de la piel.

En la Figura 4.22 se puede observar el corte histológico de la piel. El estrato córneo es la capa más externa y actúa como una barrera física, lipofílica, la cual evita la pérdida excesiva

de agua y previene la penetración de las moléculas. Está formada por unas 20 capas de células muertas, abundantes en queratina y sin núcleos. Su formación resulta del proceso de proliferación y diferenciación de los queratinocitos que inicia en la capa basal y se caracteriza por una alteración en la expresión de proteínas, que depende de la localización de la célula en la epidermis y el sitio anatómico de la piel (Schwarz, 2003). Estos queratinocitos anucleados se encuentran embebidos en una matriz lipídica no fosfolipídica, la cual está compuesta por diferentes lípidos en cantidades equivalentes: ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres.

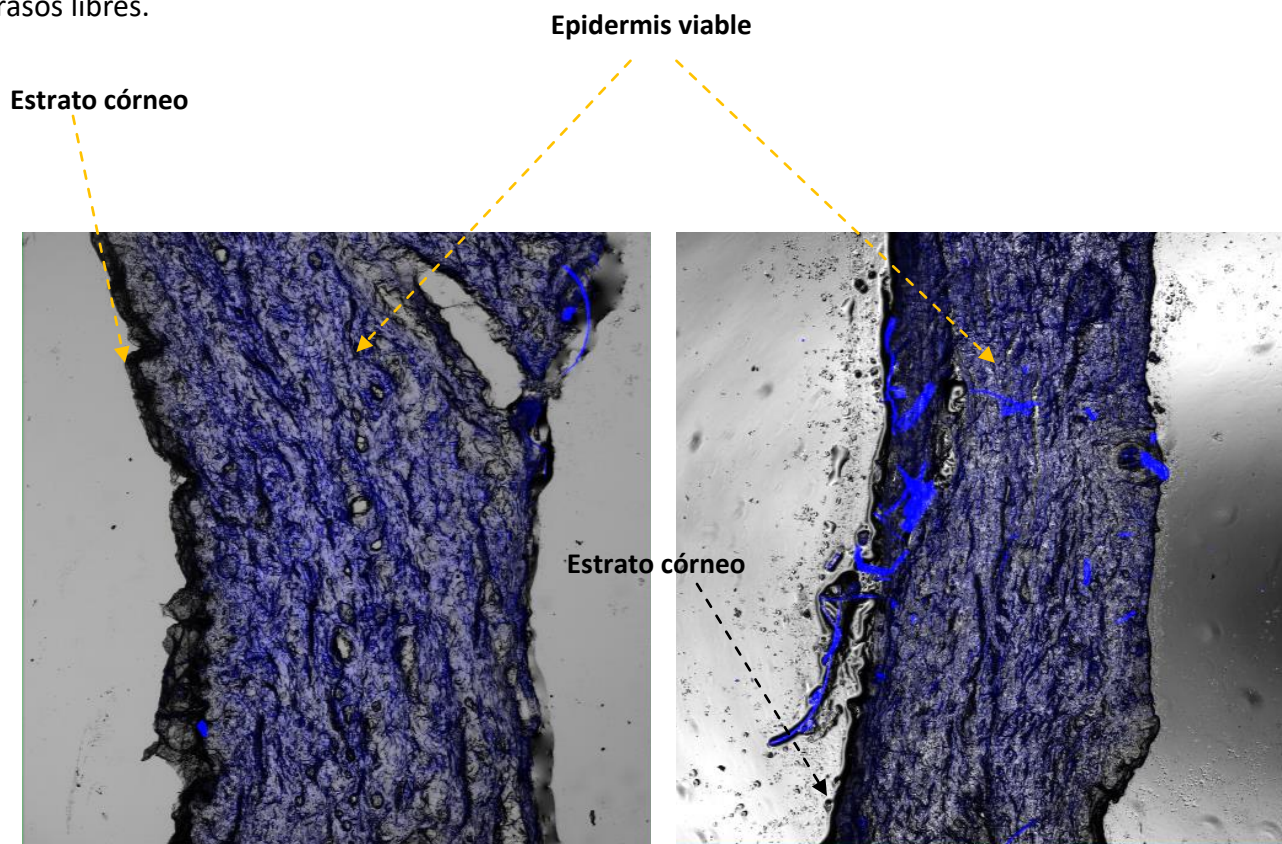


Figura 4.23. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido laser (CSLM) de las secciones transversales criosectionadas del explanto después de 1 h de contacto directo con aceite de cabreuva

La evaluación de la difusión del compuesto activo en contacto con piel a través del estrato córneo se llevó a cabo mediante la observación de los cortes histológicos de las micrografías por microscopía confocal (Figura 4.23).

De las observaciones por CSLM de las muestras dérmicas en contacto con el apósito después de distintos tiempos de exposición (1, 4 y 8 horas) se deduce que luego de 1 hora el compuesto activo se concentra mayormente en la región delimitada por el estrato córneo (Figura 4.24 a). Asimismo, las observaciones revelaron la difusión del compuesto hacia las regiones de la epidermis viable. Este resultado fue confirmado a través del seccionamiento óptico (Figura 4.23) donde se observó un máximo de intensidad de fluorescencia alrededor de 30 μm para el caso de muestras dérmicas después de 1 hora de contacto directo con el AE.

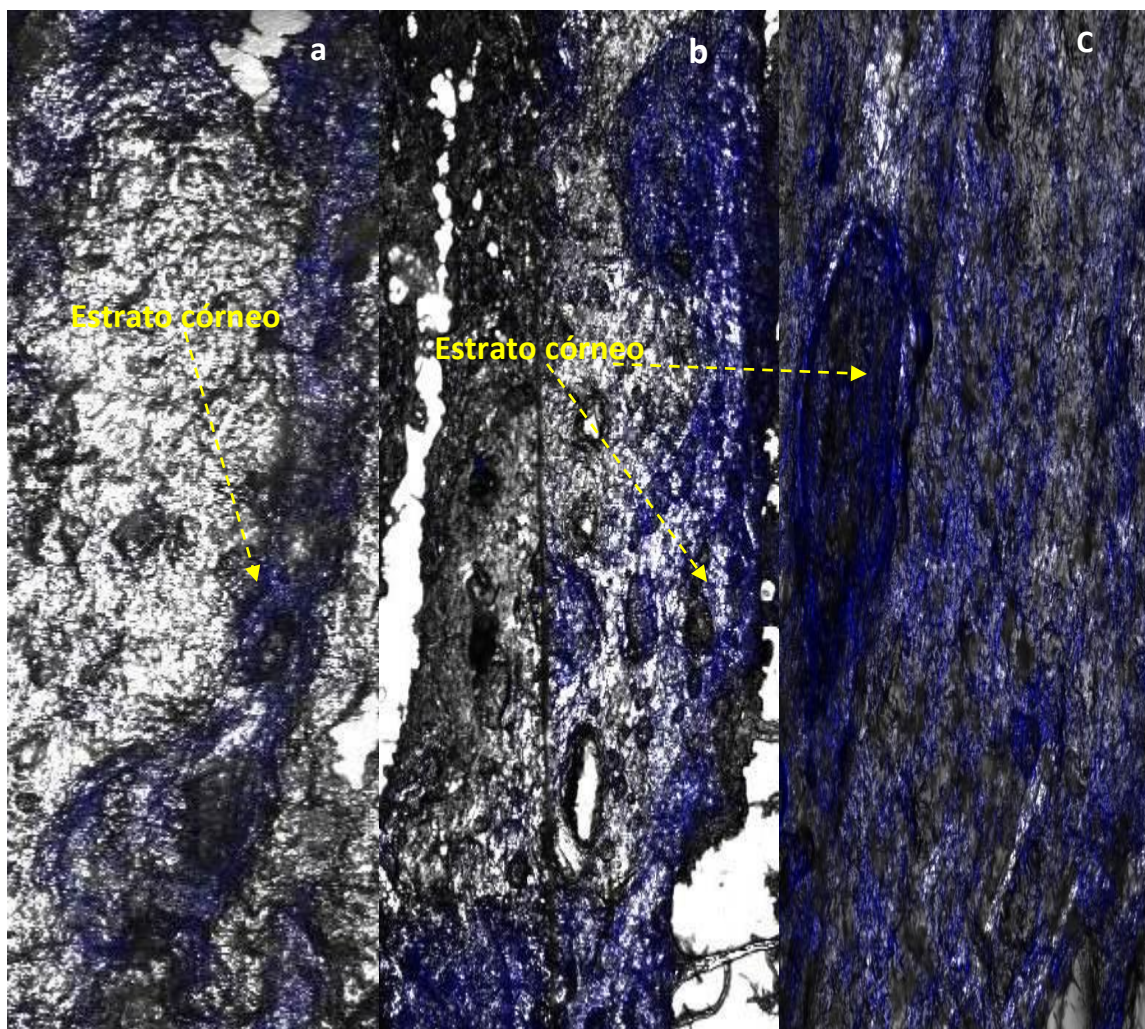


Figura 4.24. Imágenes por microscopía confocal de barrido laser (CSLM) de las secciones transversales criosectionadas de piel después en contacto con el apósito durante: **a)** 1 hora, **b)** 4 horas y **c)** 8 horas.

Para tiempos más prolongados la difusión del aceite esencial alcanza regiones más profundas a nivel de penetración del compuesto (Figura 4.24 b y c) con una distribución homogénea del mismo.

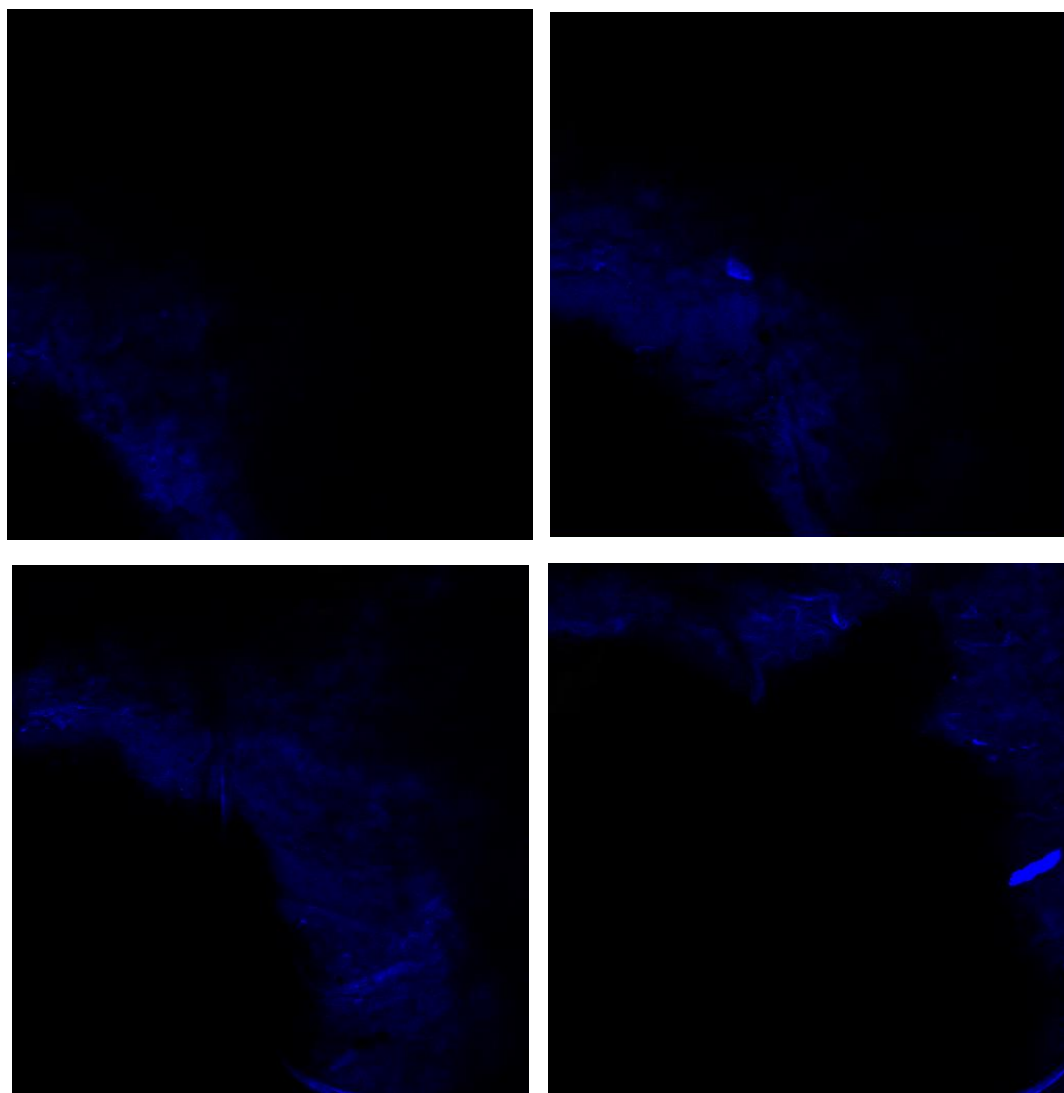


Figura 4.25. *Z-stacking* analizado por microscopía confocal de barrido laser (CSLM) de un explanto después de incubación con aceite de cabreuva durante 8h.

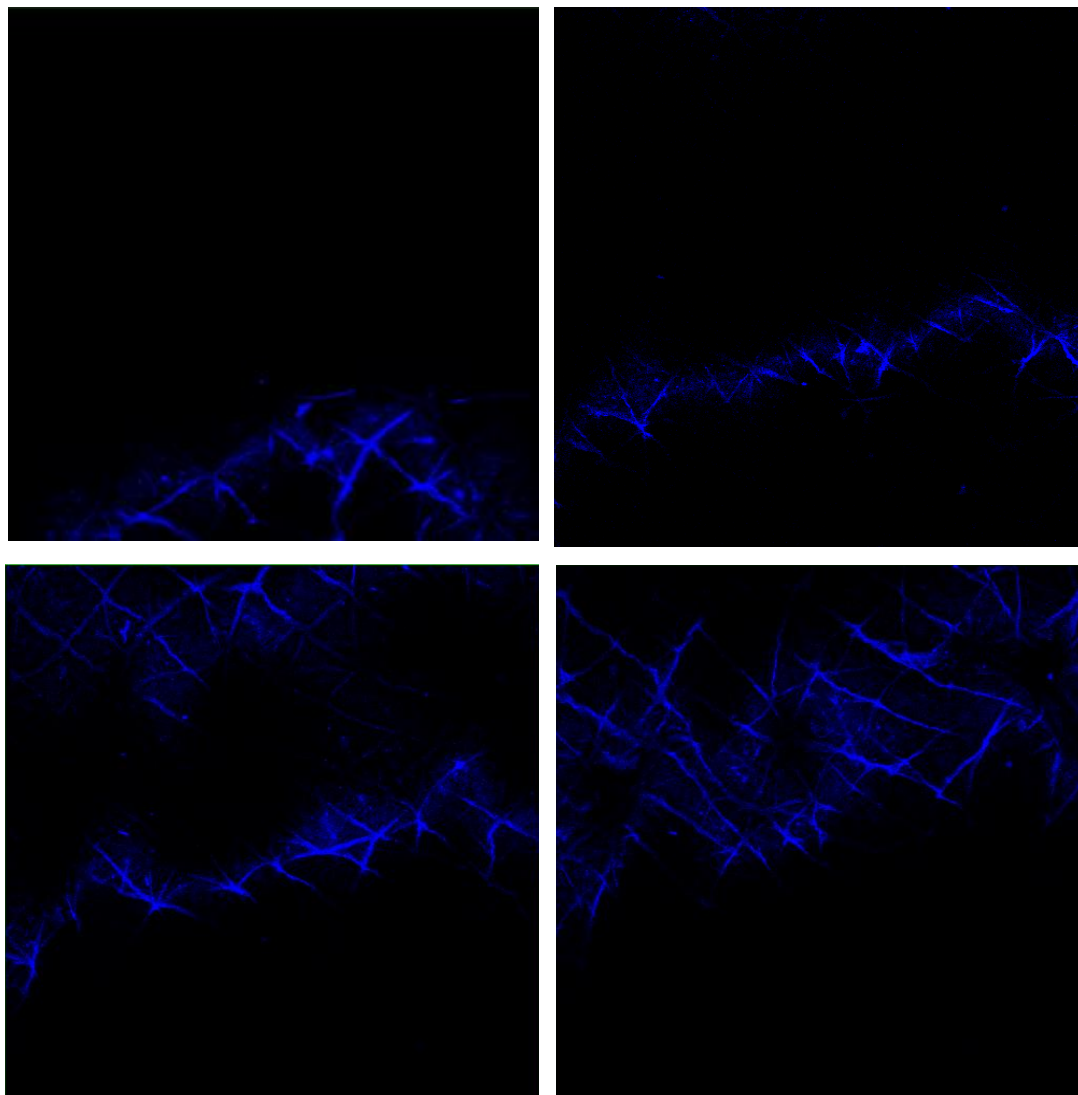


Figura 4.26. *Z-stacking* analizado por microscopía confocal de barrido laser (CSLM) de un explanto después de incubación con el apósito funcionalizada con aceite de cabreuva durante 1 h

En las Figuras 4.25 y 4.26 se observan distintas regiones obtenidas a través del seccionamiento óptico de las muestras ensayadas para distintos tiempos de contacto apósito-explanto.

Mientras tanto el máximo de intensidad de fluorescencia se desplazó desde 10 a 50 μm de profundidad medido en el explanto para la película en contacto con la piel durante 1 y 8 horas, respectivamente (Figura 4.27 b). El resultado obtenido para el apósito que estuvo en

contacto con 8 h alcanzó un nivel de profundidad similar al observado para el AE después de 1 hora de contacto (Figura 4.27 a).

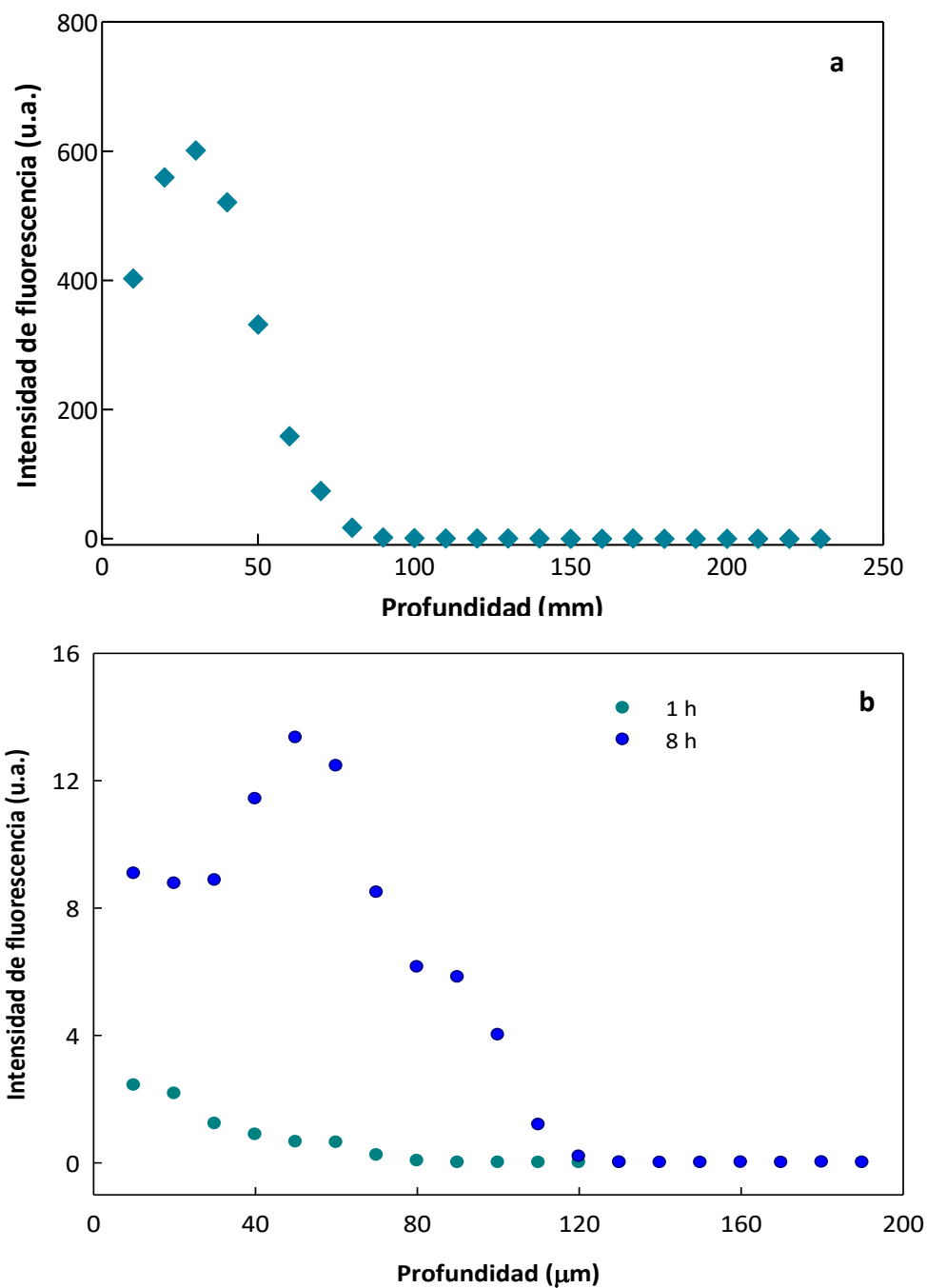


Figura 4.27. Perfil de penetración obtenido a través de medidas de seccionamiento óptico de: **a)** piel en contacto directo con aceite esencial de cabreuva; **b)** piel en contacto con la película EE_A-PVA 1:1 después de un contacto de 1 y 8 horas.

El perfil de penetración confirmó lo mencionado acerca de las imágenes obtenidas por CSLM, demostrando que el aceite esencial se distribuyó uniformemente a las 8 horas y alcanzó una profundidad en el sustrato dérmico de 50 μm .

El AE de cabreuva liberado se cuantificó mediante HPLC. A partir del cromatograma se determinó el tiempo de elución del nerolidol patrón utilizado, el cual se evidenció a los 13 min. Mediante los estudios cromatográficos se pudo estimar la cantidad liberada del AE en el explanto después de permanecer en contacto con el apósito durante 1 y 8 h (Tabla 4.10). Al poner en contacto el apósito con explanto y proceder a la cuantificación del aceite esencial presente a tiempos crecientes en los explantos se detectó el aumento del contenido de aceite esencial (cuantificado como trans nerolidol) con el aumento del tiempo de exposición (Tabla 4.9). Ese aumento en el contenido del AE se produjo como consecuencia de la transferencia de materia desde el apósito, y por lo tanto se observó una cantidad decreciente del compuesto en la película.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la concentración de AE liberada en el explanto fue 10 veces mayor al cabo de 8 h de contacto apósito-explanto que el valor obtenido después de 1 h, confirmando los resultados visualizados mediante CSLM.

Tabla 4.10. Concentración de compuesto activo dosificado en el explanto mediante HPLC

Muestra	Tiempo (h)	Masa explanto (g)	Concentración másica nerolidol (mg g^{-1})	Concentración másica de AE (mg g^{-1})
Explanto 1	1	0,460	0,001508 ($2,1 \cdot 10^{-4}$)	$1,933 \times 10^{-3}$
Explanto 2	8	0,419	0,01524 ($6,7 \cdot 10^{-4}$)	$0,195 \times 10^{-3}$

4.4.7 Citotoxicidad sobre células de la línea HaCat-a

La Figura 4.28 muestra el porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos después de 24 horas de contacto con SDS, aceite

emulsificado con SDS, emulsiones entrecruzadas utilizadas en la formulación de los apósitos (EE_A), así como sus respectivas diluciones. El SDS exhibió una toxicidad significativa ($p < 0,05$) reflejado en el valor de viabilidad celular que resultó menor que el 50% con respecto al control de células viables. Por otra parte, las diferentes emulsiones de aceite esencial llevaron a valores de viabilidad celular por encima del 50%. La emulsión con una concentración de aceite del 7,5% v/v exhibió el mayor porcentaje de viabilidad celular. Este hecho podría deberse a un efecto protector del aceite contra la toxicidad del SDS, la cual demostró ser significativa ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observó ese efecto protector del AE cuando se usaron mayores concentraciones (15% v/v) lo que indicaría que a este nivel la toxicidad del SDS se ve enmascarado por la citotoxicidad del aceite. Este resultado es similar al observado por Bucci y col. (2017) al evaluar la citotoxicidad de extractos de arándanos. Como se mencionó previamente, el aceite esencial de cabreuva está mayoritariamente constituido por trans-nerolidol, compuesto con demostrada citotoxicidad en células carcinogénicas (Hanušová y col., 2017). Este comportamiento también se observó en las emulsiones, generándose una menor viabilidad de células en contacto con la emulsión cargada con compuesto activo en comparación con la emulsión formulada con quitosano, PVA y SDS.

En relación a la citotoxicidad de células en contacto con las películas (Figura 4.28) se pudo observar que tanto las matrices sin el compuesto activo como las funcionalizadas con aceite esencial de cabreuva, mostraron una viabilidad significativamente superior ($p < 0,05$) al 50% con respecto al control. Vale la pena señalar que la película funcionalizada con aceite esencial de cabreuva llevó a una disminución en el porcentaje de viabilidad lo cual podría atribuirse a que una fracción del AE podría estar ubicado en la superficie de la película sin encapsular, generando así un ligero efecto citotóxico (Bakare y col., 2017). Por otra parte, la película de PVA generó una ligera disminución en la viabilidad celular con respecto a las películas que contenían emulsiones con y sin aceite (Figura 4.29). Pathan y col. (2015) afirman que la citotoxicidad del PVA podría atribuirse a la presencia de cadenas más cortas presentes en el polímero.

En todos los casos en los cuales se evaluó la citotoxicidad de las películas la viabilidad celular fue superior al 50% lo cual indica que estos materiales son aptos para ser utilizados como biomateriales (Pereira da Silva y col. 2016)

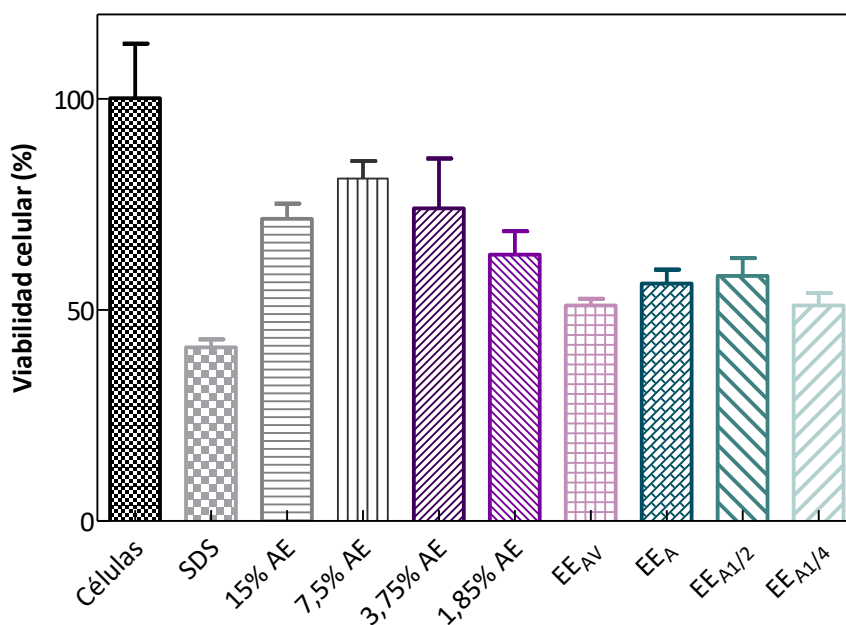


Figura 4.28. Porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos frente a la solución control de SDS (1g l^{-1}), distintas emulsiones de aceite esencial con SDS, emulsiones entrecruzadas con citrato de sodio y sus diluciones (1/2 y 1/4).

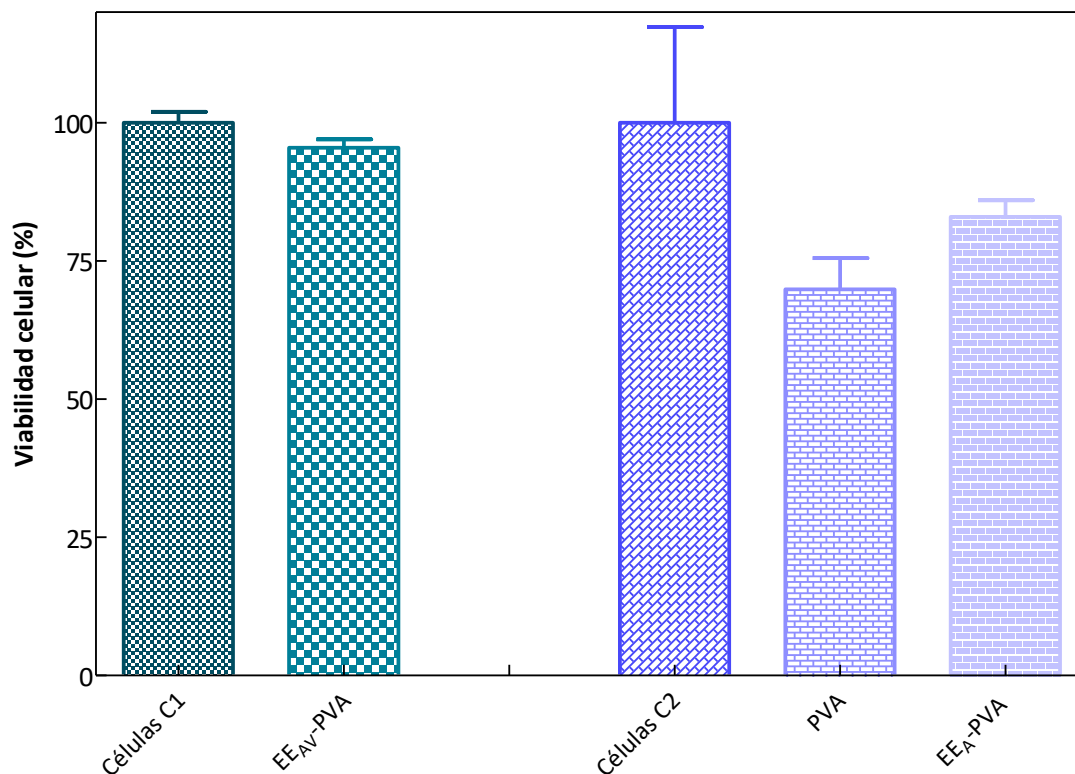


Figura 4.29. Porcentaje de viabilidad de las células de la línea HaCat-a derivadas de keratinocitos humanos frente a matrices de PVA con inclusión de emulsión entrecruzada sin AE (EE_{AV} -PVA), y películas de PVA y apósito (EE_A -PVA). En cada caso se muestran los controles correspondientes: Células C1 y Células C2.

4.4.8. Ensayos de regeneración celular

En la Figura 4.29 se observan las fotografías obtenidas de los distintos ensayos de regeneración.

Como ya se explicó en la *sección 4.3.9.5 de Materiales y métodos* se hizo una estría en el césped de células tal como se observa en la Figura 4.30a. A partir del ensayo de regeneración celular, se pudo establecer que en presencia de la película de PVA no se produjo la regeneración celular no presentando diferencias con respecto al control de células ($p < 0,05$) (Figura 4.23a y b).

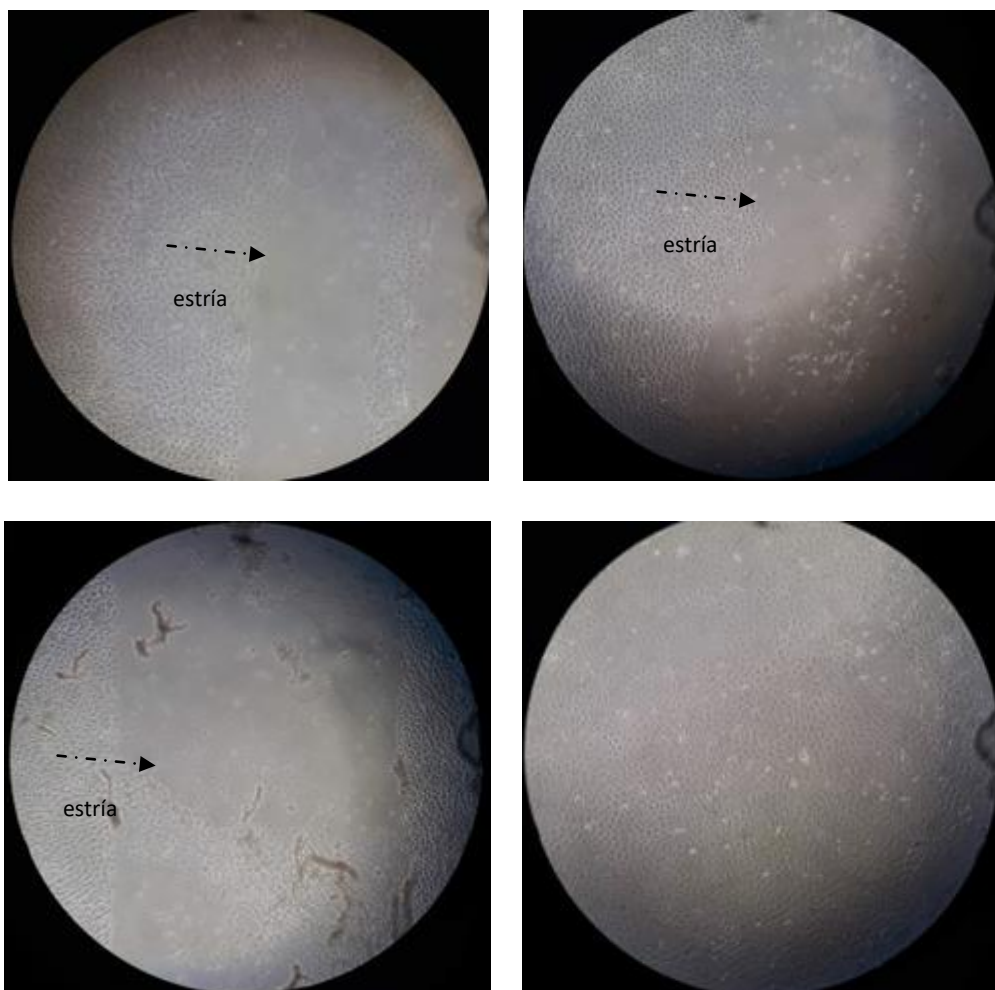


Figura 4.30. Capturas de muestras de células incubadas a 37°C durante 24 h: **a)** Control del estado inicial de las células; **b)** en contacto con películas PVA 1%, **c)** EE_A-PVA 1:1 sin aceite (vacía) y **d)** EE_A-PVA 1:1 funcionalizadas con AE.

Las películas formuladas sin el agregado de aceite esencial de cabreuva mostraron un comportamiento similar. Sin embargo, en los ensayos realizados con las muestras funcionalizadas con AE se observó que este sistema produjo la regeneración al cabo de 24 horas. A partir de estos resultados se puede deducir la existencia de un efecto sinérgico entre los componentes de la emulsión (quitosano, PVA, SDS, citrato de sodio y aceite esencial), el cual estimula o mejora la capacidad regeneradora de los apósitos. Este efecto fue similar al observado por Ferreira y col. (2016) quienes comprobaron que la combinación de quitosano

con trans-nerolidol en bajas concentraciones produjo un aumento en la capacidad regeneradora en sustratos dérmicos debido a la mayor proliferación de fibroblastos.

4.5 Conclusiones

Se desarrolló un apósito a base de un material biodegradable con incorporación de una emulsión formulada con quitosano, SDS, aceite esencial de cabreuva y un entrecruzante como el citrato de sodio. La secuencia y las etapas involucradas en el proceso de obtención del apósito derivaron en un desarrollo novedoso. Se logró diseñar un material antimicrobiano con propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua y al oxígeno adecuadas para ser utilizado en aplicaciones dérmicas superficiales. Su baja solubilidad pero alta capacidad de hinchamiento por tratarse de un producto hidrofílico, permitieron diseñar un material con integridad estructural sin detrimento de la capacidad de liberación del compuesto activo en forma controlada.

Se pudo visualizar cuali y cuantitativamente la penetración del aceite esencial en los distintos estratos de la piel produciéndose esto por efecto de la presencia de trans-nerolidol como compuesto mayoritario en el aceite esencial de cabreuva. Las películas funcionalizadas con aceite esencial de cabreuva no presentaron citotoxicidad frente a las células de la línea HaCat-a y mostraron capacidad para producir regeneración celular al cabo de 24 horas.

En conclusión, el material desarrollado podría ser utilizado en quemaduras superficiales o heridas leves como apósitos debido a su demostrada funcionalidad como dispositivos de liberación controlada.

Referencias

Abdelrazek, E.M., Elashmawi, I.S., y Labeeb, S. (2010), Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of PVA/PVP blend films. *Physica B: Condensed Matter*, 405(8), 2021-2027.

Abdullah, Z. W., Dong, Y., Davies, I. J., y Barbhuiya, S. (2017). PVA, PVA blends, and their nanocomposites for biodegradable packaging application. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 56(12), 1307-1344.

Andreu, V., Mendoza, G., Arruebo, M., y Irusta, S. (2015). Smart dressings based on nanostructured fibers containing natural origin antimicrobial, anti-inflammatory, and regenerative compounds. *Materials*, 8(8), 5154-5193.

Aoki, T., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2005). Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 209-220.

Azzi, J., Danjou, P. E., Landy, D., Ruellan, S., Auezova, L., Greige-Gerges, H., y Fourmentin, S. (2017). The effect of cyclodextrin complexation on the solubility and photostability of nerolidol as pure compound and as main constituent of cabreuva essential oil. *Beilstein journal of organic chemistry*, 13(1), 835-844.

Azizi, S., Ahmad, M. B., Ibrahim, N. A., Hussein, M. Z., y Namvar, F. (2014). Preparation and properties of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend bio-nanocomposites reinforced by cellulose nanocrystals. *Chinese Journal of Polymer Science*, 32(12), 1620-1627.

Bakare, R., Wells, L., McLennon, N., Singh, M., Gugssa, A., Stubbs III, J., Zewde, B., y Raghavan, D. (2017). Formulation of silver chloride/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(AgCl/PHBV) films for potential use in bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(31), 45162.

Bisen, D.S., Bhatt, R., Bajpai, A.K., Bajpai, R., y Katare, R. (2017). Reverse indentation size effects in gamma irradiated blood compatible blend films of chitosan-poly (vinyl alcohol) for possible medical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 982-993.

Bonilla, J., Fortunati, E.L.E.N.A., Atarés, L., Chiralt, A., y Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463-470.

Boyde, A. (1990). Confocal optical microscopy. In *Modern Microscopies* (pp. 185-204). Springer, Boston, MA.

Brehm-Stecher, B.F., y Johnson, E.A. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3357-3360.

Bucci, P., Prieto, M.J., Milla, L., Calienni, M.N., Martinez, L., Rivarola, V., Alonso, S., y Montanari, J. (2017). Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1-11.

Can, A.S., Erdal, M.S., Güngör, S., y Özsoy, Y. (2013). Optimization and characterization of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron. *Molecules*, 18(5), 5455-5471.

Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., y Alonso, M.J. (1997). Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid and Polymer Science*, 275(1), 46-53.

Carlo, B.V.D., y Habert, A.C. (2018). Composite membranes: surface properties and thermal stability. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23(2).

Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., y Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648-653.

Chatterjee, S., Salaün, F., Campagne, C., Vaupre, S., Beirão, A., y El-Achari, A. (2014). Synthesis and characterization of chitosan droplet particles by ionic gelation and phase coacervation. *Polymer Bulletin*, 71(4), 1001-1013.

Custódio, D.L., y Veiga-Junior, V.F. (2012). True and common balsams. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 1372-1383.

Diamant, H., y Andelman, D. (2000). Self-assembly in mixtures of polymers and small associating molecules. *Macromolecules*, 33(21), 8050-8061.

Di Giorgio, L., Salgado, P.R., y Mauri, A.N. (2019). Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocolloids*, 87, 891-901.

Ferreira, M.O.G., Leite, L.L.R., de Lima, I.S., Barreto, H.M., Nunes, L.C.C., Ribeiro, A.B., Osajima J.A. y da Silva Filho, E.C. (2016). Chitosan hydrogel in combination with nerolidol for healing wounds. *Carbohydrate Polymers*, 152, 409-418.

Garg, A., y Singh, S. (2014). Targeting of eugenol-loaded solid lipid nanoparticles to the epidermal layer of human skin. *Nanomedicine*, 9(8), 1223-1238.

Gracia-Valenzuela, M. H., Orozco-Medina, C., y Molina-Maldonado, C. (2012). Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica*, 22(3), 201-206.

Güngör, S., Bektaş, A., Alp, F. İ., UydeS-Doğan, B. S., Özdemir, O., Araman, A., y Özsoy, Y. (2008). Matrix-type transdermal patches of verapamil hydrochloride: in vitro permeation studies through excised rat skin and pharmacodynamic evaluation in rats. *Pharmaceutical Development and Technology*, 13(4), 283-289.

Guirguis O.W., y Moselhey M.T.H. (2012). Thermal and structural studies of poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. *Natural Science*, 4 (1), 57-67.

Hanušová, V., Caltová, K., Svobodová, H., Ambrož, M., Skarka, A., Murínová, N., Králová, V., Tomšík, P., y Skálová, L. (2017). The effects of β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol

on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 828-836.

Harborne, J. B., Gottlieb, O. R., y Magalhães, M.T. (1963). Occurrence of the Isoflavone Afromosin in Cabreuva Wood. *The Journal of Organic Chemistry*, 28(3), 881-882.

Harrewijn, P., van A.M. Oosten, y P.G.M. Piron, 2001. *Natural Terpenoids as Messengers*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Hou, Z., Gao, Y., Yuan, F., Liu, Y., Li, C., y Xu, D. (2010). Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of β -carotene emulsion stabilized by soybean soluble polysaccharides and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8604-8611.

Hong, K. H. (2016). Preparation and properties of polyvinyl alcohol/tannic acid composite film for topical treatment application. *Fibers and Polymers*, 17(12), 1963-1968.

Hu, C., Li, J., Liu, D., Song, R., Gu, J., Prempeh, N., y Li, H. (2017). Effects of the coagulation temperature on the properties of wet-spun poly (vinyl alcohol)–graphene oxide fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(43).

Ibrahim, S. A., y Li, S. K. (2010). Chemical enhancer solubility in human stratum corneum lipids and enhancer mechanism of action on stratum corneum lipid domain. *International journal of pharmaceutics*, 383(1-2), 89-98.

Jiang, P., Hao, X.H., y Sun, M. (2012). Characterization of antibacterial film based on PVA and clove oil/ β -cyclodextrin inclusion complex. In *Applied Mechanics and Materials* (Vol. 217, pp. 1018-1021). Trans Tech Publications.

Julio, L. M., Copado, C. N., Diehl, B. W., Ixtaina, V. Y., y Tomás, M. C. (2018). Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT*, 89, 581-590.

Kavoosi, G., Nateghpoor, B., Dadfar, S. M. M., y Dadfar, S.M.A. (2014). Antioxidant, antifungal, water binding, and mechanical properties of poly (vinyl alcohol) film incorporated with essential oil as a potential wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*, 31(20).

Kavoosi, G., Bordbar, Z., Dadfar, S.M., y Dadfar, S.M.M. (2017). Preparation and characterization of a novel gelatin–poly (vinyl alcohol) hydrogel film loaded with *Zataria multiflora* essential oil for antibacterial–antioxidant wound-dressing applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(39).

Kontogiannidou, E., Demertzidou, V. P., Andreadis, D. A., Demiri, E., Ritzoulis, C., Zografos, A. L., y Fatouros, D. G. (2017). Evaluation of sesquiterpenes as permeation enhancers for a model macromolecule across human skin in vitro. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 384-389.

Kubo, S., y Kadla, J. F. (2003). The formation of strong intermolecular interactions in immiscible blends of poly (vinyl alcohol)(PVA) and lignin. *Biomacromolecules*, 4(3), 561-567.

Lamarra, J., Rivero, S., y Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 717-726.

Lewandowska, K, (2009), Miscibility and thermal stability of poly (vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochimica Acta*, 493(1-2), 42-48.

Li, F., Li, J., Wen, X., Zhou, S., Tong, X., Su, P., Li, H., y Shi, D. (2009). Anti-tumor activity of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles: An in vitro study. *Materials Science and Engineering: C*, 29(8), 2392-2397.

Li, H. Z., Chen, S. C., y Wang, Y. Z. (2015). Preparation and characterization of nanocomposites of polyvinyl alcohol/cellulose nanowhiskers/chitosan. *Composites Science and Technology*, 115, 60-65.

Lipatov, Y. S., y Alekseeva, T. T. (2007). Phase-separated interpenetrating polymer networks. In *Phase-Separated Interpenetrating Polymer Networks* (pp. 1-227). Springer, Berlin, Heidelberg.

Liu, X., Quan, P., Li, S., Liu, C., Zhao, Y., Zhao, Y., & Fang, L. (2017). Time dependence of the enhancement effect of chemical enhancers: Molecular mechanisms of enhancing kinetics. *Journal of Controlled Release*, 248, 33-44.

Mardila, V.T., Wulandari, I.O., Shobirin, R.A., Santjojo, D.J., y Sabarudin, A. (2016). *In-situsynthesis* and characterization of chitosan-Fe₃O₄nanoparticles using tripolyphosphate/citrate as cross-linker. *Scientific study &research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 17(3), 249

Martinetz D., y Hartwig R. (1998). *Taschenbuch der Riechstoffe*, VerlagHarri Deutsch Frankfurt/M

Mendanha Neto, S.A. (2014). Interações de terpenos com membranas de eritrócito, fibroblasto, estrato córneo e membrana modelo e interações de uma nanopartícula de ouro com membranas modelo. Tesis de doctorado (Univerisdad Federal de Goias)

Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., y Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), 111-123.

Montanari, J., Maidana, C., Esteva, M.I., Salomon, C., Morilla, M.J., y Romero, E.L. (2010). Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. *Journal of Controlled Release*, 147(3), 368-376.

Mun, S., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2005). Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant– chitosan layers. *Langmuir*, 21(14), 6228-6234.

Naduparambath, S., Sreejith, M.P., Jinitha, T.V., Shaniba, V., Aparna, K.B., y Purushothaman, E. (2018). Development of green composites of poly (vinyl alcohol)

reinforced with microcrystalline cellulose derived from sago seed shells. *Polymer Composites*, 39(9), 3033-3039.

Niazi, M.B.K., Jahan, Z., Berg, S.S., y Gregersen, Ø. W. (2017). Mechanical, thermal and swelling properties of phosphorylated nanocellulose fibrils/PVA nanocomposite membranes. *Carbohydrate Polymers*, 177, 258-268.

Nisar, T., Wang, Z. C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., y Guo, Y. (2018). Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 670-680.

Nistal, Á.M. (2013). Microscopía láser confocal. Universidad de Oviedo. Disponible en: <http://www.unioviedo.es/BOS/Novedades/Libro/0prefac.pdf>. Acceso em, 21.

Olabisi O., Robeson L.M., y Shaw M.T. (1979). *Polymer–polymer miscibility*. New York: Academic Press.

Pathan, S.G., Fitzgerald, L.M., Ali, S.M., Damrauer, S.M., Bide, M.J., Nelson, D.W., Pherran C., Phaneuf T.M., y Phaneuf, M.D. (2015). Cytotoxicity associated with electrospun polyvinyl alcohol. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(8), 1652-1662.

Pereira da Silva A., Macedo, T. L., Coletta, D. J., Feldman, S., y Pereira, M. D. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxicity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Bioactive Glass hybrid scaffolds obtained by lyophilization. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 21(4), 964-973.

Popescu, M.C. (2017). Structure and sorption properties of CNC reinforced PVA films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 783-790.

Pudney, P.D., Mélot, M., Caspers, P.J., Van Der Pol, A., y Puppels, G.J. (2007). An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans retinol to the skin. *Applied Spectroscopy*, 61(8), 804-811.

Ramadan, E., Borg, T., Abdelghani, G.M., y Saleh, N.M. (2016). Transdermal microneedle-mediated delivery of polymeric lamivudine-loaded nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 5(1), 1.

Ramaraj, B., y Poomalai, P. (2006). Ecofriendly poly (vinyl alcohol) and coconut shell powder composite films: Physico-mechanical, thermal properties, and swelling studies. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(4), 3862-3867.

Silva, H.D., Cerqueira, M.A., y Vicente, A.A. (2015). Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 167, 89-98.

Schubert, V., Dietrich, A., Ulrich, T., y Mosandl, A. (1992). The stereoisomers of nerolidol: Separation, analysis and olfactoric properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47(3-4), 304-307.

Sheik, S., Nagaraja, G. K., Naik, J., y Bhajanthri, R. F. (2017). Development and characterization study of silk fibre reinforced poly (vinyl alcohol) composites. *International Journal of Plastics Technology*, 21(1), 108-122.

Stamkulov, N.S., Mussabekov, K.B., Aidarova, S.B., y Luckham, P.F. (2009). Stabilisation of emulsions by using a combination of an oil soluble ionic surfactant and water soluble polyelectrolytes. I: Emulsion stabilization and Interfacial tension measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 335(1-3), 103-106.

Sunintaboon, P., Pumduang, K., Vongsetskul, T., Pittayanurak, P., Anantachoke, N., Tuchinda, P., y Durand, A. (2012). One-step preparation of chitosan/sodium dodecyl sulfate-stabilized oil-in-water emulsion of Zingiber cassumunar Roxb. oil extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 414, 151-159.

Schwarz, T. (2003). Skin immunity. *British Journal of Dermatology*, 149 (66),2-4.

Tao, R., Wang, C.Z., y Kong, Z.W. (2013). Antibacterial/antifungal activity and synergistic interactions between polyprenols and other lipids isolated from *Ginkgo Biloba* L. leaves. *Molecules*, 18(2), 2166-2182.

Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 545-554.

Vuong, C., y Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481-489.

Wagemaker, T. A. L., Rijo, P., Rodrigues, L. M., Maia Campos, P. M. B. G., Fernandes, A. S., y Rosado, C. (2015). Integrated approach in the assessment of skin compatibility of cosmetic formulations with green coffee oil. *International journal of cosmetic science*, 37(5), 506-510.

Wagner, H., Kostka, K.H., Lehr, C.M., y Schaefer, U.F. (2000). Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharmaceutical Research*, 17(12), 1475-1481.

Wang, Y., Li, D., Wang, L. J., y Adhikari, B. (2011). The effect of addition of flaxseed gum on the emulsion properties of soybean protein isolate (SPI). *Journal of Food Engineering*, 104(1), 56-62.

Wang, M.O., Etheridge, J. M., Thompson, J. A., Vorwald, C.E., Dean, D., y Fisher, J.P. (2013). Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of cross-linked biomaterials. *Biomacromolecules*, 14(5), 1321-1329.

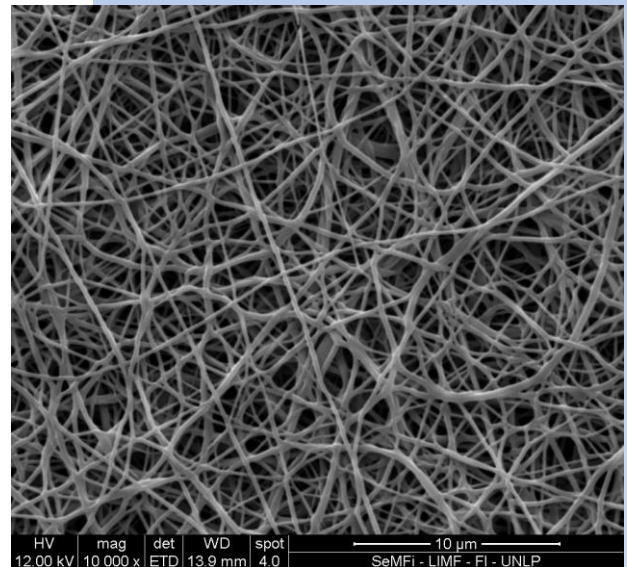
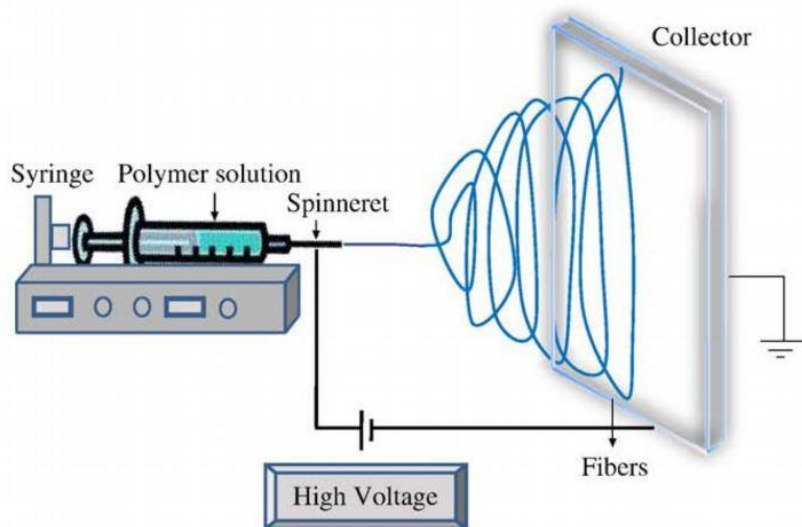
Wright, S.J., Centonze, V.E., Stricker, S.A., DeVries, P.J., Paddock, S.W., y Schatten, G. (1993). Introduction to confocal microscopy and three-dimensional reconstruction. In *Methods in Cell Biology*, (Vol. 38, pp. 1-45). Academic Press.

Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., y Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbylpalmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 292-297.

Zhang, D., Zhou, W., Wei, B., Wang, X., Tang, R., Nie, J., y Wang, J. (2015). Carboxyl-modified poly (vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 125, 189-199.

Zimmermann, E. (2008). *Aromatherapie für Heil- und Pflegeberufe*, Sonntag Verlag Stuttgart.

Capítulo 5



Capítulo 5

5.1 Introducción

Dentro del campo de la nanotecnología, el empleo de procesos electrodinámicos constituye uno de los métodos de vanguardia permitiendo la formación de nanoestructuras a partir de diferentes polímeros. En particular, la técnica se denomina *electrospinning* o electrohilado cuando se generan fibras continuas ultra delgadas con diámetros cercanos a los 100 nm mientras que cuando se producen estructuras capsulares se conoce como *electrospraying* o electropulverizado (Drossou y col., 2017; Soto y col., 2016).

El mecanismo de formación de estructuras nanofibrosas es sumamente complejo, pero casi todos los polímeros que pueden solubilizarse o fundirse pueden ser electrohilados. Durante el proceso se hace pasar un fluido a través de una boquilla capilar en presencia de un campo eléctrico producido por una fuente de alto voltaje (del orden de los kV) (Caracciolo y col., 2011). El esquema del equipo de *electrospinning* se observa en la Figura 5.1.

Cuando este llega a determinado valor de voltaje, se vence la tensión superficial de la pequeña gota que se forma en el extremo de la boquilla, generándose un chorro (*jet*) líquido cargado eléctricamente que se acelera hacia una región de menor potencial donde se encuentra un colector conectado a tierra (Figura 5.2). En este proceso, por medio de una jeringa se inyecta una solución de un polímero conductor, la aguja adosada a la jeringa se conecta a uno de los terminales de una fuente de alto voltaje y el otro terminal se conecta a una placa colectora, generando así un campo eléctrico de alta intensidad. A medida que el solvente se evapora el *jet* se estrecha produciendo fibras continuas (de longitudes inferiores al micrón) formando una membrana tridimensional altamente porosa. La técnica tiene la característica de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, con relativamente alta velocidad y simplicidad en el diseño del equipamiento. La selección adecuada de los parámetros del proceso permite controlar la morfología de las fibras obtenidas

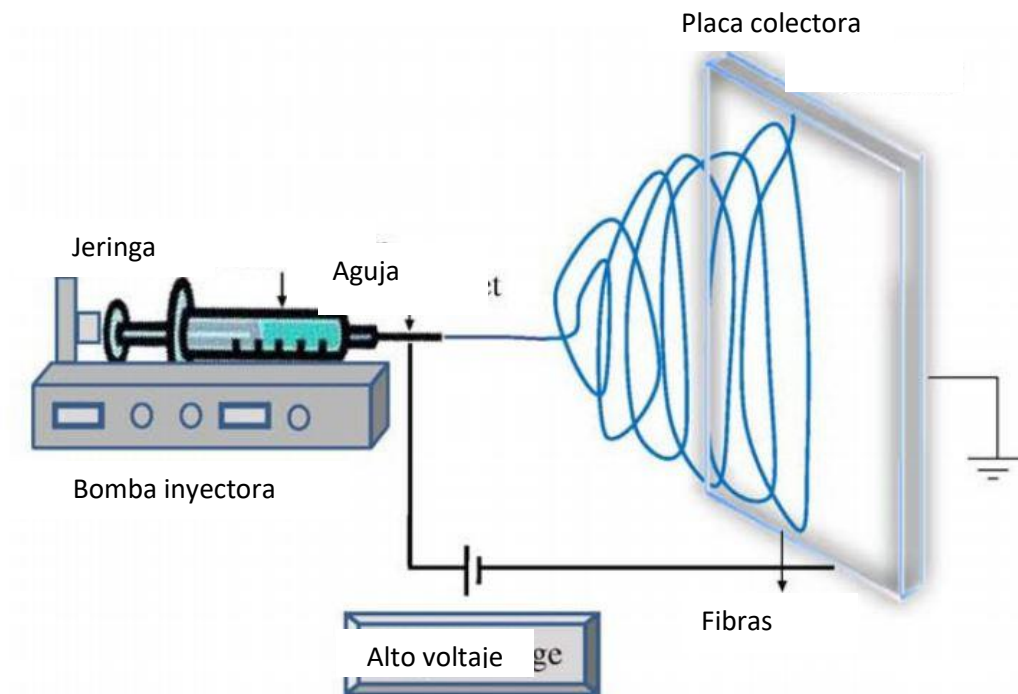


Figura 5.1. Esquema del equipo de *electrospinning*. Figura obtenida de Karimi y col. (2015).

La metodología de electrohilado ha sido reconocida como una técnica de obtención de fibras en el rango de 5 a 500 nm, mucho más delgadas que las fibras obtenidas por métodos tradicionales (Deitzel y col., 2001; Karimi y col., 2015). La tecnología de electrohilado se ha desarrollado y evolucionado en los últimos tiempos; por las características del proceso, esta técnica requiere el uso de un campo electrostático haciendo posible la obtención de fibras con mayores longitudes, respecto a otras metodologías.

Recientemente se ha destacado la utilidad de nanoestructuras obtenidas por electrohilado, en relación a las aplicaciones biomédicas, debido a su similitud estructural con la matriz extracelular, a una alta relación área superficial-volumen, incremento de la elasticidad y una buena bioestabilidad (Sapru y col., 2018); estos autores trabajaron con

fibras proteicas obteniendo matrices con buena estabilidad y óptimas propiedades mecánicas.

Existen en el mercado sistemas que utilizan nanofibras en dispositivos para la liberación controlada de fármacos. Estos permiten la liberación de una droga en un sitio específico. En esta dirección, la producción de entramados de fibras cuya disposición tenga un patrón de alineamiento, aporta importantes propiedades a los biomateriales en campos como la ingeniería de tejidos. Estas nanoestructuras, por su arquitectura se utilizan también para aplicaciones tópicas donde una malla o red compuesta por nanofibras se coloca directamente sobre la piel sana, sobre heridas o quemaduras de manera que el compuesto activo difunda hasta alcanzar su sitio de acción (Caracciolo y col., 2011).

Actualmente, los estudios se han focalizado en aplicaciones entre las que se destaca la utilización de sensores fisiológicos (Ghosh y col., 2017), matrices protectoras de pieles (Guo y col., 2017), dispositivos de liberación controlada de fármacos (Pal y col., 2017).

Según Sonina y col. (2011) existen diversos factores que controlan el tamaño y la morfología de las fibras entre los que se encuentran:

- las propiedades del solvente, entendiéndose como tal la presión de vapor, punto de fusión, viscosidad, conductividad y tensión superficial
- la naturaleza y el peso molecular del polímero
- la concentración y por ende la viscosidad del polímero
- el campo eléctrico aplicado y la distancia entre el colector y la aguja, que pueden variar entre 3 a 5 kV/cm y 15 a 20 cm, respectivamente.
- la humedad y la temperatura ambiente

Uno de los polímeros más utilizados para la obtención de nanofibras es el alcohol polivinílico. La obtención de velos de nanofibras a base de PVA es relativamente sencilla si se compara con otros tipos de polímeros debido a su solubilidad en agua. En algunos casos se ha empleado este polímero entrecruzándolo con ácido maleico para aplicaciones como sistemas filtrantes (Qin y col., 2008). También se ha utilizado para mejorar la capacidad de formación de fibras del quitosano, permitiendo compatibilizar polímeros de diferente

naturaleza (Zhang y col., 2014). Asimismo, Ranjbar-Mohammadi y col. (2017) estudiaron las propiedades de fibras goma de tragacanto y PVA funcionalizadas con curcumina producidas mediante electrohilado, obteniendo resultados satisfactorios de adhesión celular. Por otra parte, Puttamayutanon y col. (2012) desarrollaron fibras activas de PVA funcionalizadas con miel tailandesa con propiedades antibacterianas y antioxidantes. El PVA también ha sido utilizado para formar fibras compatibilizadas con emulsiones de poliestireno debido a que la hidrofobicidad de este último compuesto no permite la utilización de solventes conductores dificultando la formación de fibras por esta metodología (Angeles y col., 2008).

Actualmente, son incipientes los desarrollos de nanoestructuras que compatibilicen polímeros y aceites esenciales. Allahvaisy y col. (2017) trabajaron con ácido poliláctico y dos aceites esenciales *Mentha piperita* L. y *Salvia officinalis*.

Según nuestro conocimiento, la utilización de alcohol polivinílico para obtener fibras por electrohilado como soporte de aceites esenciales es prácticamente inexistente.

En este Capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

- Obtener nanoestructuras fibrosas mediante la técnica de electrohilado a partir de soluciones con diferente concentración de PVA y sus mezclas con emulsiones entrecruzadas funcionalizadas con aceite esencial de cabreuva.
- Evaluar el comportamiento reológico de las soluciones de PVA y su mezcla con emulsiones entrecruzadas funcionalizadas.
- Examinar la morfología de las fibras obtenidas por microscopía electrónica de barrido SEM y microscopía confocal de barrido láser.
- Evaluar el comportamiento térmico y las propiedades microestructurales de las nanoestructuras formadas y compararlas con películas obtenidas por la metodología de moldeo y deshidratación.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Formulación de las soluciones

Las soluciones de PVA (Elvanol T-25 con un grado de hidrólisis del 86-89%) se prepararon con una concentración de 12, 14 y 16% p/v por solubilización en agua destilada bajo agitación magnética a una temperatura de 90°C durante 5 h.

La nomenclatura utilizada para las soluciones de PVA preparadas al 12 y 14% fue PVA₁₂ y PVA_E, respectivamente. Una vez seleccionada la concentración de PVA necesaria para la obtención de fibras continuas y regulares en toda su extensión mediante SEM, se funcionalizaron mediante el ensamblado de las emulsiones entrecruzadas con citrato de sodio y cargadas con aceite esencial de cabreuva (EE_A) previamente descritas en la *Sección 4.3.3 del Capítulo 4*.

A tal fin, se preparó una solución de PVA con una concentración superior a la seleccionada (16% p/v) y se incorporaron emulsiones en diferentes proporciones de tal manera de alcanzar una concentración final de PVA+EE que pudiera electroestirarse sin fallas. La proporción seleccionada en base a estos ensayos fue 4:1 (PVA:emulsión entrecruzada). Una vez sometida al proceso de electrohilado, la nomenclatura adoptada para la nanoestructura fibrosa fue PVA+EE_E.

5.2.2 Formación de fibras por electrohilado

El principio de funcionamiento del electrohilado consiste en aplicar un alto voltaje del orden de kilovolts a una solución polimérica, provocando la salida de una gota en el extremo de la aguja. El campo eléctrico llega a un valor crítico y vence la fuerza de tensión superficial de la solución polimérica, por lo que la gota comienza a alargarse formando el llamado cono de Taylor. El cono de Taylor es una forma estable de la suspensión de la disolución polimérica en la punta de la aguja. Esta surge como resultado del equilibrio entre las fuerzas eléctricas aplicadas y la tensión superficial. El cono cambia de forma a medida que se modifica el

potencial, partiendo de una gota con bajos potenciales hasta la forma cónica bien definida en los potenciales mayores (Calzón Gutiérrez, 2016).

Seguido del cono de Taylor se crea un hilo, el cual se conoce como *jet*. Este *jet* cargado eléctricamente consta de dos etapas, una etapa estable y una inestable. La estable es la que se forma seguida del cono de Taylor debido a un proceso de estiramiento y suele ser la que se observa mediante algún dispositivo de visualización (cámara digital). En cuanto a la etapa inestable, conocida como zona de latigazo (*whipping region*) es donde el *jet* se desestabiliza debido a que la solución comienza a evaporarse, con la consecuente reducción del diámetro de los hilos que se depositan en el sistema colector. Al final, después de la zona inestable los hilos comienzan a depositarse en el colector, creando andamios de nanofibras. Tomando como base esta explicación, el proceso de electrohilado consta de tres etapas fundamentales que son la formación del cono de Taylor, la expulsión del *jet* que es la zona estable y la región de inestabilidad del *jet*.

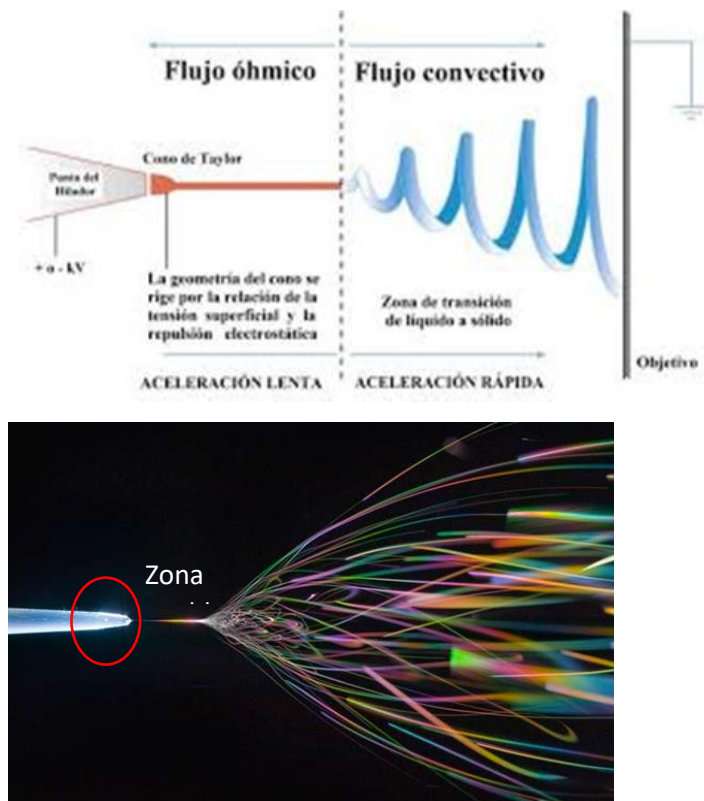


Figura 5.2. Esquema representativo de la formación del Cono de *Taylor* durante el proceso de electrohilado.

El equipo experimental utilizado en el presente trabajo de Tesis consta de cuatro componentes: un reservorio de solución polimérica (PVA o sus mezclas con emulsión), una bomba de infusión a jeringa PC11UB APEMA (Argentina) que permitió suministrar un flujo comprendido entre 0,3 y 1 ml h⁻¹ de solución polimérica, una fuente de alta tensión (hasta 30 kV) y un sistema colector de acero inoxidable. La Figura 5.3 muestra los componentes del sistema que constituyen la base del equipo (de construcción casera) empleado para los procesos electrodinámicos. En base a ensayos previos se escogió un flujo de 0,4 ml h⁻¹ y un voltaje de 24 kV una distancia placa colectora-aguja de 27 cm y una distancia entre los electrodos de 29 cm manteniendo el sistema una disposición horizontal.

Las nanofibras se depositaron en el sistema colector de acero inoxidable durante un tiempo de permanencia de 5 horas hasta la obtención de una película con un espesor capaz de desmoldarse de la superficie de contacto.



Figura 5.3. Dispositivo experimental ensamblando la fuente de alta tensión, la bomba infusora y la placa colectora utilizado para producir fibras mediante el proceso de electrohilado.

La nomenclatura utilizada para las nanoestructuras fibrosas obtenidas mediante procesos electrodinámicos fue PVA_E, indicando en los casos donde fue conveniente la concentración de polímero utilizada.

Con fines comparativos se prepararon películas de PVA al 14% p/v por el método de moldeo y secado a 37°C, esta matriz se denominó PVA_M.

5.2.3 Propiedades reológicas de las soluciones

Las propiedades reológicas de un fluido se definen a partir de la relación existente entre la aplicación de un sistema de fuerzas externas, representadas matemáticamente mediante el esfuerzo de corte o de cizalla " τ " y su respuesta dinámica cuantificada mediante la velocidad de deformación " $\dot{\gamma}$ ". Con el fin de establecer y describir el comportamiento de flujo de las soluciones se utilizó un reómetro Haake RheoStress600 (Alemania) con un sistema sensor plato-plato de superficies rugosas, con una distancia entre platos de 1mm. A partir de los ensayos rotacionales se obtuvieron las curvas de flujo de esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación.

5.2.4 Caracterización de la morfología y tamaño de las fibras

El análisis morfológico de las nanofibras se realizó a través de microscopía electrónica de barrido, técnica que fue descrita en el *Capítulo 3 II Sección 3.II.3.1*. El diámetro de las fibras fue calculado mediante el uso del programa Fiji (Image J). A través de esta técnica se evaluó también la morfología de las fibras formadas.

Asimismo, en los casos de las nanoestructuras funcionalizadas con aceite esencial de cabreuva se recurrió a la utilización de la técnica de microscopía confocal láser de barrido para visualizar la distribución del compuesto activo en la malla.

5.2.5 Caracterización de las nanoestructuras obtenidas

Se evaluaron propiedades fisicoquímicas relacionadas con la afinidad por el agua (contenido de humedad, permeabilidad al vapor de agua) siguiendo las técnicas ya descriptas.

Asimismo, el comportamiento térmico se analizó por MDSC y TGA. Desde el punto de vista estructural, se realizaron estudios espectroscópicos por difracción de rayos X y ATR-FTIR a fin de dilucidar las diferencias en relación a las matrices de PVA obtenidas por moldeo (PVA_M), además de examinar las diferencias observadas luego de la incorporación de la emulsión entrecruzada funcionalizada.

5.3 Resultados

5.3.1 Comportamiento reológico de las soluciones

La selección adecuada de los parámetros del proceso permite controlar el diámetro de las fibras y sus características. La concentración de la solución polimérica es uno de los factores que determinan la morfología y el tamaño de las fibras poliméricas electrohiladas. En este sentido, el conocimiento de la viscosidad es fundamental para determinar el comportamiento de una solución que será sometida a este proceso (Wang, 2008). A concentraciones bajas del polímero, el enmarañamiento de cadenas en la solución es insuficiente y se produce una dispersión de cuentas o gotas aisladas, fenómeno conocido como electropulverizado (*electrospraying*). A concentraciones intermedias se obtiene una combinación de cuentas distribuidas irregularmente y fibras, mientras que a concentraciones más elevadas se producen fibras libres de cuentas. Sin embargo, viscosidades muy altas dificultan la fluidez de la solución obstruyendo la punta del inyector (Larrondo y col., 1981; Sukigara y col., 2013). Teniendo en cuenta estas variables del proceso, es necesario optimizar la viscosidad de la solución a electrohilar y por ende la concentración de polímero.

En la Figura 5.4 a se muestra el esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación para las emulsiones reforzadas con citrato de sodio, la solución de PVA al 14% y la suspensión de PVA cargada con la emulsión entrecruzada (PVA+EE).

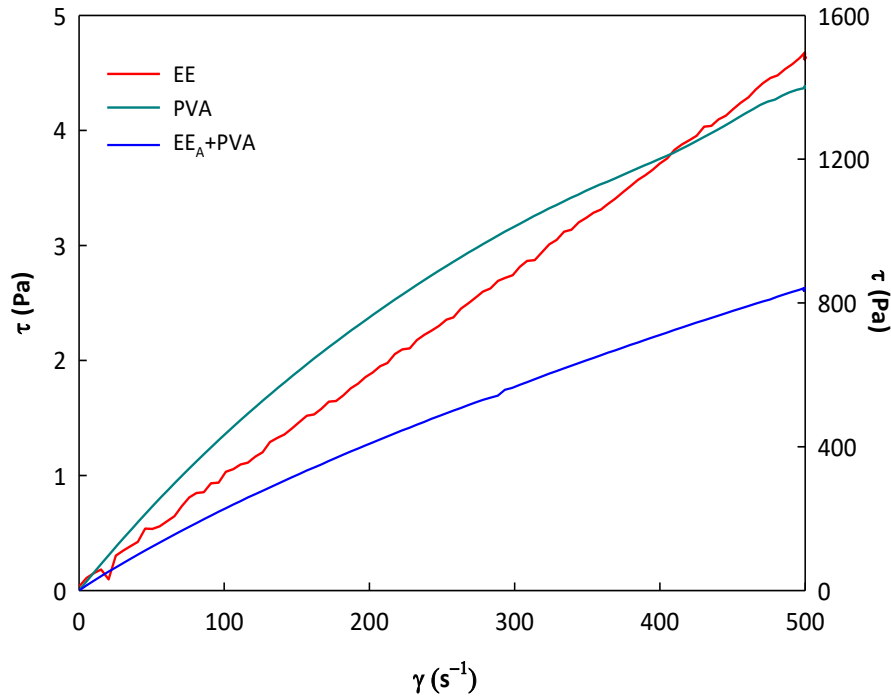


Figura 5.4. Comportamiento de flujo de las soluciones poliméricas ensayadas. Esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación. Lectura de EE sobre eje y izquierdo, PVA y EE_A+PVA sobre eje y derecho.

A partir de los ensayos rotacionales se obtuvieron las curvas de flujo de las soluciones poliméricas. Las emulsiones presentaron un comportamiento newtoniano, mientras las soluciones de PVA y compuestas a base de PVA+EE formuladas para el proceso de electrohilado exhibieron un comportamiento no-newtoniano. Para estas soluciones, el comportamiento reológico se ajustó matemáticamente utilizando el modelo de Ostwald de Waele,

$$\tau = k\dot{\gamma}^{nv} \quad [5.1]$$

donde,

τ , es el esfuerzo de corte, k_v es el índice de consistencia y n_v el índice de comportamiento de flujo. La viscosidad aparente fue (η) determinada a 500 s^{-1} . Los parámetros de ajuste del modelo se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Parámetros de ajuste del modelo de Ostwald de Waele y viscosidad aparente calculada a 500 s^{-1} .

Muestra*	k_v	n_v	$\eta \text{ (Pa.s) } (500 \text{ s}^{-1})$
EE	-	1,0 (0,1) ^{c,*}	0,0093 (0,002) ^a
^a PVA (sol)	24,27(0,08) ^a	0,649 (0,002) ^a	2,69 (0,03) ^c
^a PVA+EE (susp)	5,1 (0,1) ^b	0,820 (0,003) ^b	1,68 (0,07) ^b

^aLos valores informados corresponden a la rampa ascendente de la curva de comportamiento de flujo.

*Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

En la solución y en la suspensión pudo observarse que el valor del índice de consistencia fue menor que 1, reflejando un comportamiento no-newtoniano de tipo pseudoplástico, requerido para el llevar a cabo el proceso de electrohilado (Pal y col., 2017). En este caso se observó la existencia de diferencias significativas en el valor de n_v entre las muestras PVA y PVA+EE. Al ensamblar la emulsión con la solución de polímero, el valor de n_v se hizo más cercano a 1, debido a que la viscosidad de la emulsión fue de 0,0093 Pa.s. Este resultado fue similar al obtenido por Pal y col. (2017) quienes trabajaron con emulsiones de policaprolactona dispersas en una fase continua de PVA; estos autores explicaron que al disminuir el contenido de emulsión el fluido se alejó del comportamiento newtoniano.

En la Tabla 5.1 se puede observar una disminución de la viscosidad de la suspensión conteniendo la emulsión, medida a 500 s^{-1} , debido a la disminución en la concentración de PVA lo cual conlleva una menor capacidad para formar fibras. Este efecto fue explicado también por Phachamud y col. (2011) quienes formaron fibras por electrohilado utilizando distintas concentraciones de PVA registrando un aumento en la viscosidad con el aumento de concentración del polímero, con la consecuente mejora en la formación de fibras.

Un comportamiento similar fue informado por Pangon y col. (2016) quienes observaron que al aumentar la proporción de quitosano (preparado al 3% p/p) en la mezcla con PVA (preparado al 10% p/p) disminuía su viscosidad. Los autores atribuyeron este hecho a un aumento en la interacción polímero-solvente debido a la presencia del quitosano.

5.3.2 Morfología de las fibras

La Figura 5.5 muestra la apariencia macroscópica de las matrices de PVA obtenidas por electrodeposición de la solución polimérica de PVA.

Como se puede apreciar en la fotografía de la Figura 5.5, las películas exhibieron una coloración blanca mientras que las películas de PVA obtenidas por el método del moldeo y deshidratación fueron transparentes. Este hecho puede explicarse en base al proceso de dispersión de luz generado por las fibras entrecruzadas (Tijing y col., 2013). Resultados similares fueron observados por Deng y col. (2018) al comparar matrices de gelatina y zeína obtenidas por el método de moldeo y de electrohilado.

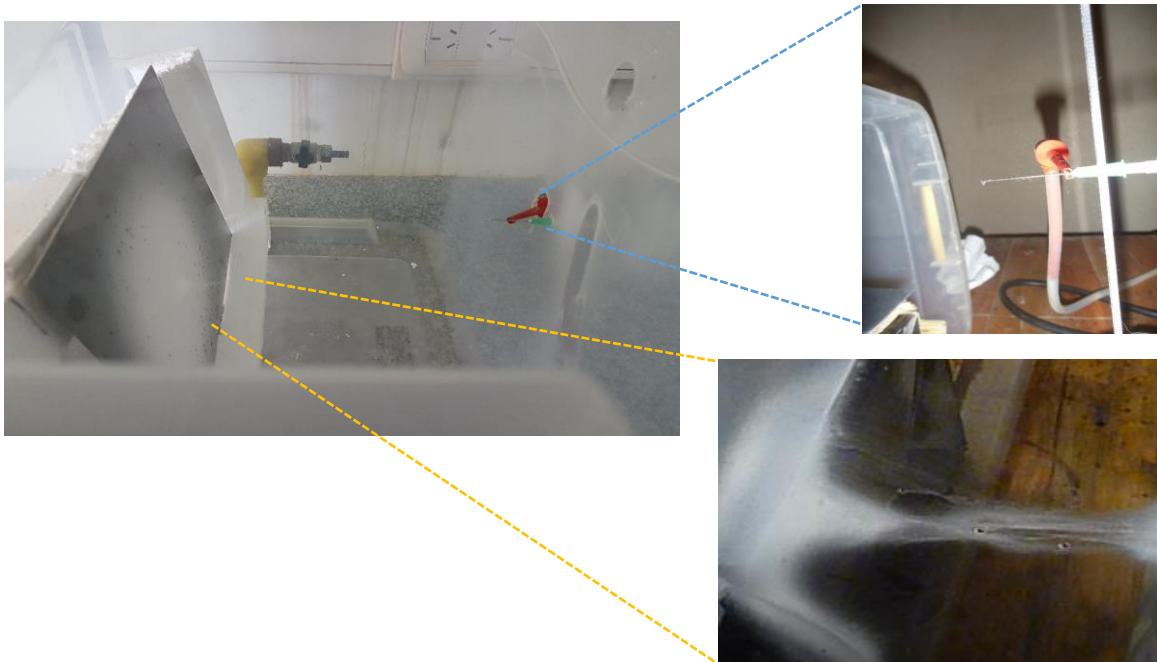


Figura 5.5. Fotografía mostrando la deposición del velo de nanofibras sobre la placa colectora de acero inoxidable. Se muestran las secciones magnificadas de la jeringa y de las fibras colectadas.

Una técnica de vital importancia para examinar la formación y la morfología de las fibras a través de procesos electrodinámicos es la microscopía SEM (Talebian y col., 2014). En la Figura 5.6 a y b se muestran las micrografías de las muestras obtenidas usando soluciones de PVA preparada al 12% y al 14% (PVA_E), respectivamente.

Como puede observarse en la Figura 5.6 la muestra PVA₁₂ presentó en su estructura la aparición de cuentas mientras que la muestra PVA_E mostró una estructura uniforme libre de perlas. Este fenómeno puede explicarse considerando la relación directa entre la concentración de polímero y la viscosidad de la solución polimérica (Phacahmud y col., 2011). También pudo observarse un menor diámetro de las fibras en la muestra PVA₁₂ debido la menor viscosidad de la solución polimérica.

Dado que es deseable la formación de fibras homogéneas, continuas y sin la presencia de cuentas en su estructura, se seleccionó la concentración del 14% (PVA_E) para obtener las matrices control.

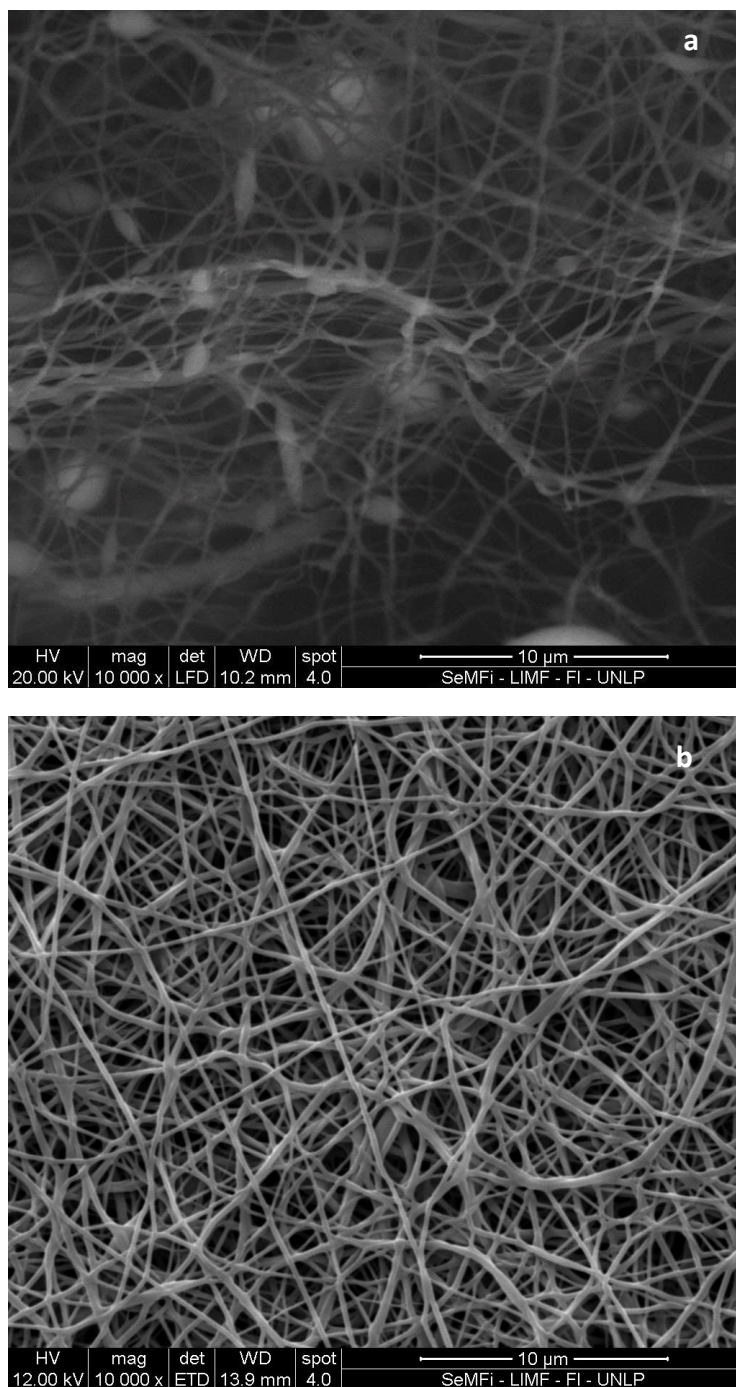


Figura 5.6. Micrografías obtenidas por SEM de mallas poliméricas obtenidas usando soluciones de PVA: **a)** PVA₁₂ y **b)** PVA_E.

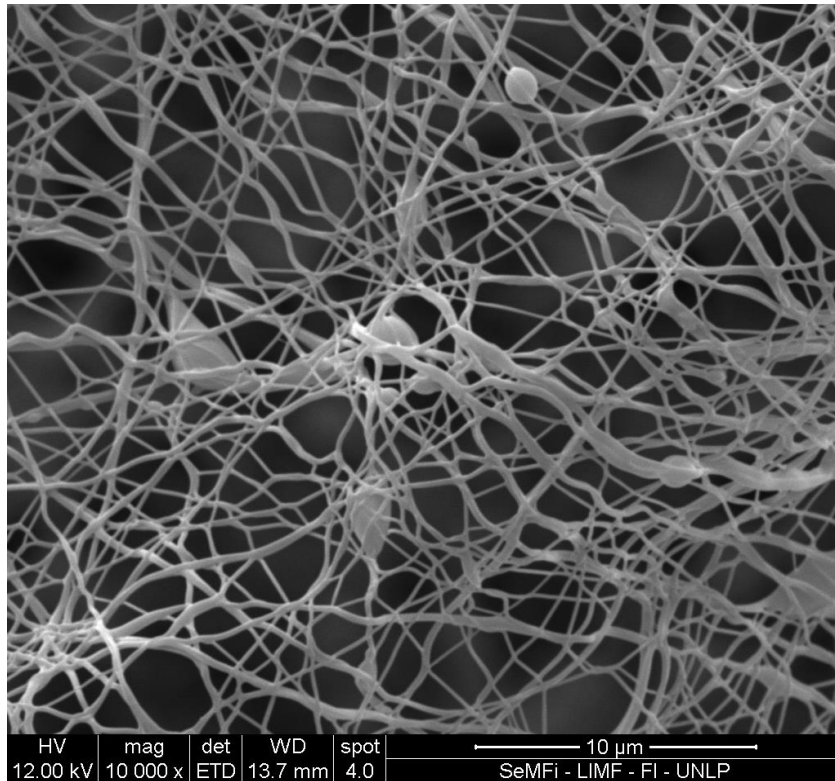


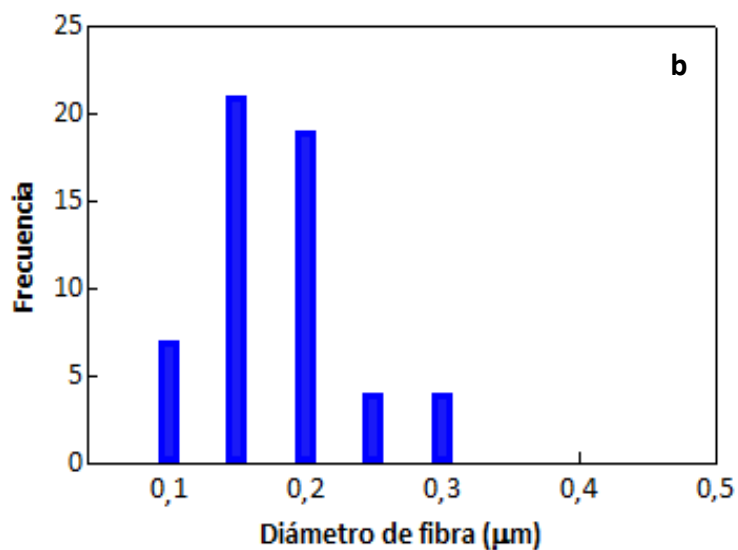
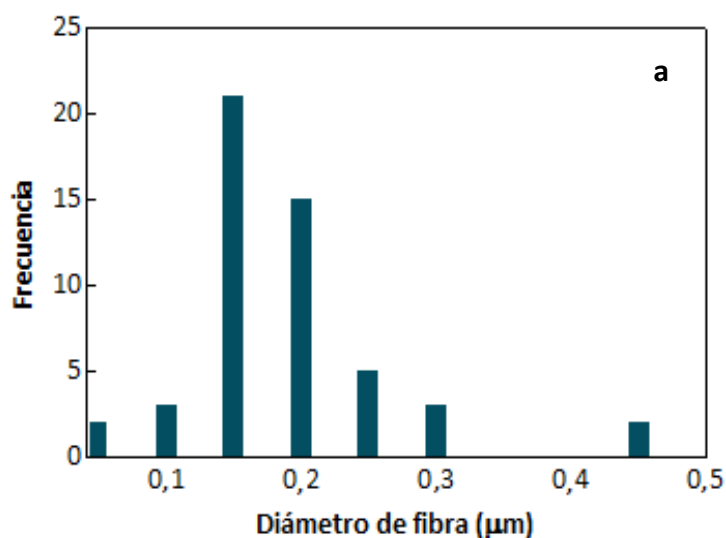
Figura 5.7. Micrografía obtenida por SEM de una malla a base de PVA con emulsión entrecruzada funcionalizada con aceite esencial de cabreuva (PVA+EE_E).

En la Figura 5.7 se puede observar la micrografía obtenida por SEM de la muestra de PVA+EE_E.

La compatibilización del polímero con la emulsión generó un sistema más fluido, con formación de cuentas interrumpiendo el entramado de las fibras de PVA. Resultados similares fueron encontrados por Puttamayutanon y col. (2012) al trabajar con matrices de PVA aditivadas con miel, observando que el agregado de miel en concentraciones crecientes produjo un aumento en el número de cuentas presentes. Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de quitosano en las emulsiones, lo cual genera una modificación en el proceso de electrohilado. Esto fue explicado más detalladamente por Talebian y col. (2014) quienes trabajaron con fibras compuestas por PVA y quitosano, variando la cantidad de este último polímero. Estos autores encontraron que una proporción de quitosano superior al 50 % llevó

a la formación de cuentas en las fibras obtenidas. Este fenómeno se atribuyó a un aumento en la tensión superficial de la solución polimérica.

En las Figuras 5.8 a, b y c se exhiben los histogramas mostrando la distribución de tamaños de fibra para cada una de las formulaciones obtenidas a través del análisis de las micrografías obtenidas por SEM.



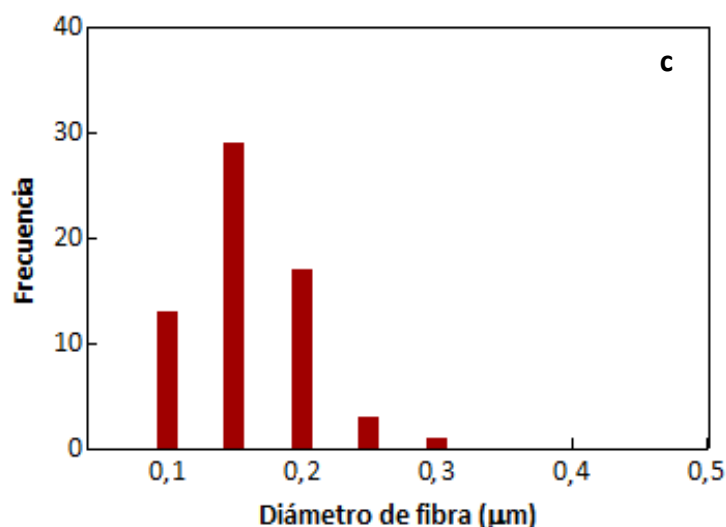


Figura 5.8. Distribución de diámetros de fibra de: **a)** PVA₁₂, **b)** PVA_E y **c)** PVA+EE_E.

Como puede observarse en la Figura 5.8 a, la muestra PVA₁₂ presentó una distribución de tamaño de fibra mayormente centrada alrededor de 150 nm. Al aumentar la concentración de polímero (PVA) si bien la distribución está centrada en 150 nm se observó un aumento en la proporción de fibras con diámetros de 200 nm aproximadamente. Estos resultados se correlacionan con las explicaciones desarrolladas anteriormente. Por otra parte, la inclusión de la emulsión en el sistema ocasionó una reducción en la población de fibras con tamaños mayores que 200 nm, con un aumento de la proporción de 150 nm.

Resultados similares fueron observados por Rieger y col. (2014) trabajando con fibras de quitosano y óxido de polietileno, funcionalizadas con cinamaldehído.

Asimismo, las micrografías obtenidas por CLSM permitieron observar una distribución uniforme del aceite de cabreuva debido a la fluorescencia inherente del compuesto activo (Figura 5.9). López-Córdoba y col. (2016) informaron resultados similares trabajando con matrices de PVA desarrolladas por electrohilado cargadas con hidrocloreuro de tetraciclina.

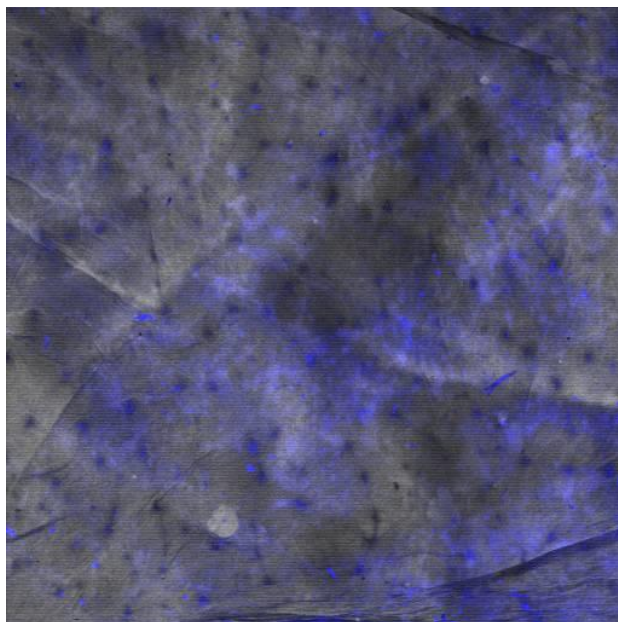


Figura 5.9. Micrografía CLSM de fibras de PVA+EE_E obtenidas por electrohilado mostrando la distribución del aceite esencial de cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*) las curvas de flujo en la nanoestructura.

5.3.3 Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua

Como puede observarse en la Tabla 5.2, la permeabilidad al vapor de agua es significativamente mayor ($p < 0,05$) en el caso de las nanoestructuras obtenidas por electrohilado. Estos resultados se atribuyen a que durante el proceso de deposición de fibras se induce la formación de una matriz porosa con el consecuente aumento en la transferencia de materia. Independientemente del procesamiento (moldeo o electrohilado) y de la formulación del sistema, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de humedad de las matrices.

Tabla 5.2. Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua de las distintas fibras.

Formulación	Humedad (%)	WVP $\times 10^{10}$ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
PVA _M	9,9 (0,6) ^a	1,10
PVA _E	11,0 (0,5) ^a	6,42
PVA+EE _E	10,0 (1,0) ^a	3,23

5.3.4 Análisis por DRX

En la Figura 5.10 se muestran los patrones de difracción de rayos X de las muestras obtenidas por moldeo y las matrices colectadas luego del proceso de electrohilado.

Como ya se explicó previamente en el *Capítulo 4* el PVA obtenido por moldeo presenta un pico agudo de difracción cristalina a $2\theta = 19^\circ$. El procesamiento del polímero por electrohilado disminuyó la intensidad del pico de difracción, fenómeno que se correlacionó con la disminución en la cristalinidad del polímero (Qin y Luang, 2008). Una tendencia similar fue observada por Basha y col. (2017) quienes detectaron una reducción significativa de la cristalinidad de matrices de PVA como consecuencia del procesamiento por electrohilado. Estos autores afirman que la disminución del grado de cristalinidad del polímero representa una ventaja para aplicaciones biomédicas. La misma tendencia siguieron los resultados informados por Enayati y col. (2016) en relación a una reducción de la cristalinidad después del proceso de electrohilado.

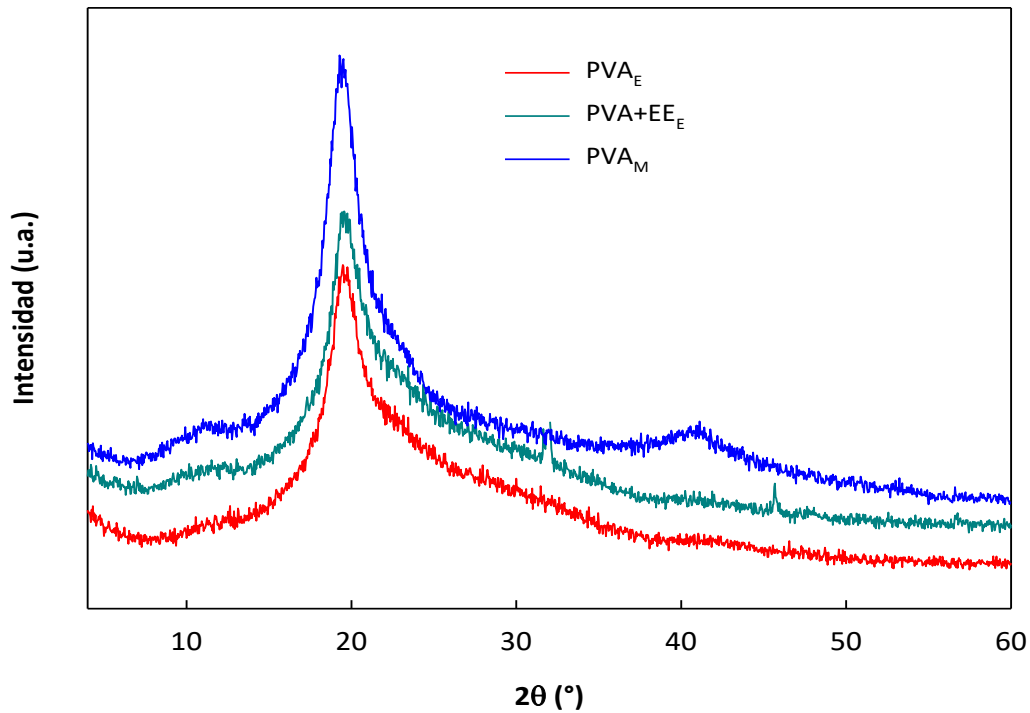


Figura 5.10. Difractogramas de rayos X de las distintas matrices a base de PVA obtenidas por electrohilado o moldeo.

Pangon y col. (2016) encontraron resultados similares al trabajar con mezclas de quitosano y PVA entrecruzadas con distintos ácidos. Estos autores señalaron que la pérdida de cristalinidad se asoció a una disminución en el arreglo de las cadenas poliméricas debido a la evaporación rápida del solvente durante el proceso de electrohilado. Asimismo, Krstic y col. (2018) sugirieron que durante el proceso de electrohilado las moléculas se orientan en la dirección de las fibras teniendo menos tiempo para alinearse entre sí, generando un empaque menos favorable. Adicionalmente estos autores remarcaron que para polímeros semicristalinos, el estiramiento de las cadenas sometidas a altas tasas de elongación no proporciona el tiempo suficiente para formar una estructura cristalina lamelar, lo que se traduce en un menor grado de cristalinidad. Según Ghosal y col. (2018) la metodología de moldeo y deshidratación genera una estructura con mayor grado de ordenamiento debido a la evaporación lenta del solvente con la consecuente formación de cristales de polímero.

Por otra parte, el agregado de emulsión al PVA no modificó el patrón de difracción en comparación con los espectros del PVA electrohilado pero generó un aumento del GC que se ubicó entre el de las muestras de PVA sometido a electrohilado y la obtenida por moldeo. Por otra parte, Enayati y col. (2016) informaron una buena correlación entre los valores de GC determinados a partir de DSC y DRX.

5.3.5 Análisis térmico (TGA y DSC)

En la Figura 5.11 se observan los termogramas obtenidos por TGA de la muestra PVA_E detectando 3 etapas de pérdida de peso, la primera está asociado a la pérdida de agua presente en la matriz (cercano a $80^{\circ}C$), la segunda atribuida a la descomposición de las cadenas de PVA ($200-350^{\circ}C$) y la tercera se relaciona con la degradación de subproductos ($350-480^{\circ}C$) generados por compuestos cíclicos conjugados (López-Córdoba y col., 2016; Van Etten y col., 2014).

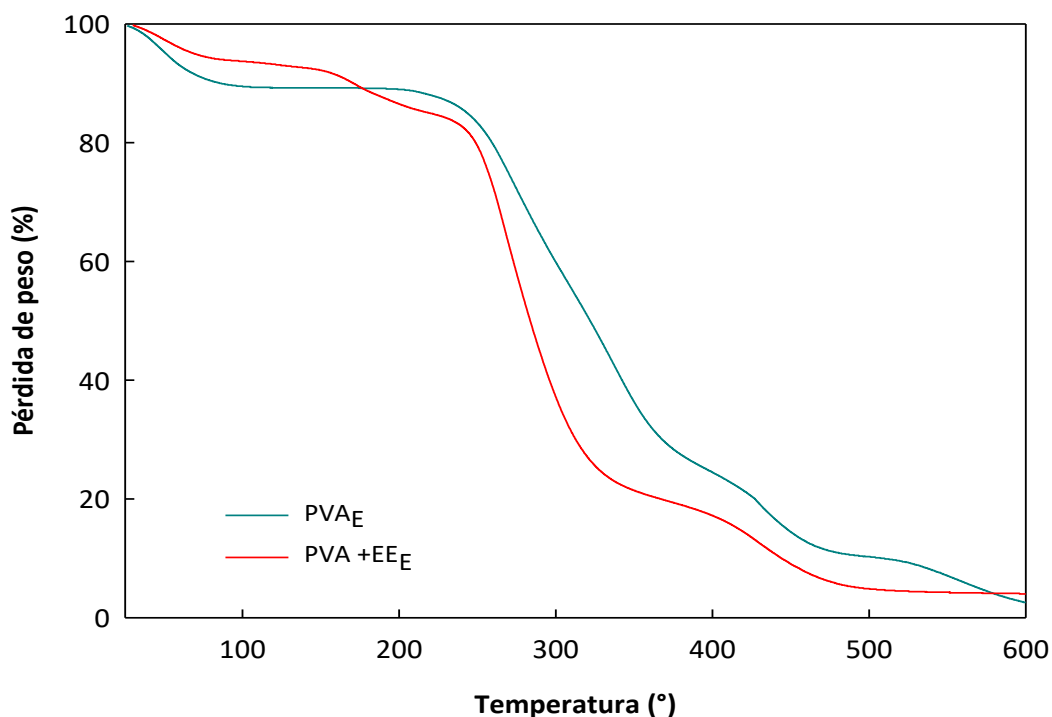


Figura 5.11. Curvas de análisis termogravimétrico de distintas muestras ensayadas obtenidas por electrohilado sin y con EE

Al igual que en las películas obtenidas en el *Capítulo 4*, no se detectaron picos asociados a la evaporación del aceite esencial (Figura 5.11 b), corroborando que el proceso de electrohilado mantuvo la configuración estructural en la que se encontraba confinado el aceite esencial inicialmente.

Como puede verse en la Figura 5.12 no se observaron diferencias en la temperatura de transición vítrea entre la muestra de PVA_E y PVA+EE_A producida por electrohilado y la muestra PVA_M. Estos resultados confirmaron la compatibilidad entre el PVA y la emulsión. Sumado a esto se puede decir que el proceso de electrohilado no generó cambios apreciables en la T_g . En este sentido, Pal y col. (2017) informaron similares resultados trabajando con matrices compuestas de PVA y emulsiones de poli(ϵ -caprolactona).

Como puede verse en la tabla inserta en la Figura 5.12, la entalpía de fusión de la fase cristalina y por ende el grado de cristalinidad, se ven disminuidas con la formación de fibras. De acuerdo a Olabisi y col. (1979) un cambio de la estructura cristalina puede ser resultado de interacciones polímero-polímero establecidas en la fase amorfa. Teniendo en cuenta esta premisa el desorden de los cristales se produjo acompañado por una reducción de la entalpía del cambio de fase. De acuerdo a Enayati y col. (2016) la reducción de la cristalinidad en fibras obtenidas por electrohilado es consecuencia del corto tiempo disponible para la evaporación del solvente que no permite obtener un alto GC. Los cambios en el GC después de la adición de la emulsión probablemente sea resultado de una hetero-nucleación.

Se puede decir que después del procesamiento por electrohilado hubo un reacomodamiento de la estructura de las cadenas poliméricas con un corrimiento significativo ($p < 0,05$) del evento endotérmico asignado a la fusión de la fase cristalina hacia menores temperaturas cuando se somete al polímero al proceso de electrohilado.

Cabe destacar que el agregado de emulsiones no generó cambios estadísticamente apreciables en la fusión de la fase cristalina, lo cual podría deberse a que en este caso la formación de las fibras no es tan eficiente como para alterar la estructura cristalina del polímero.

Estos resultados fueron concordantes con lo observado por difracción de rayos X.

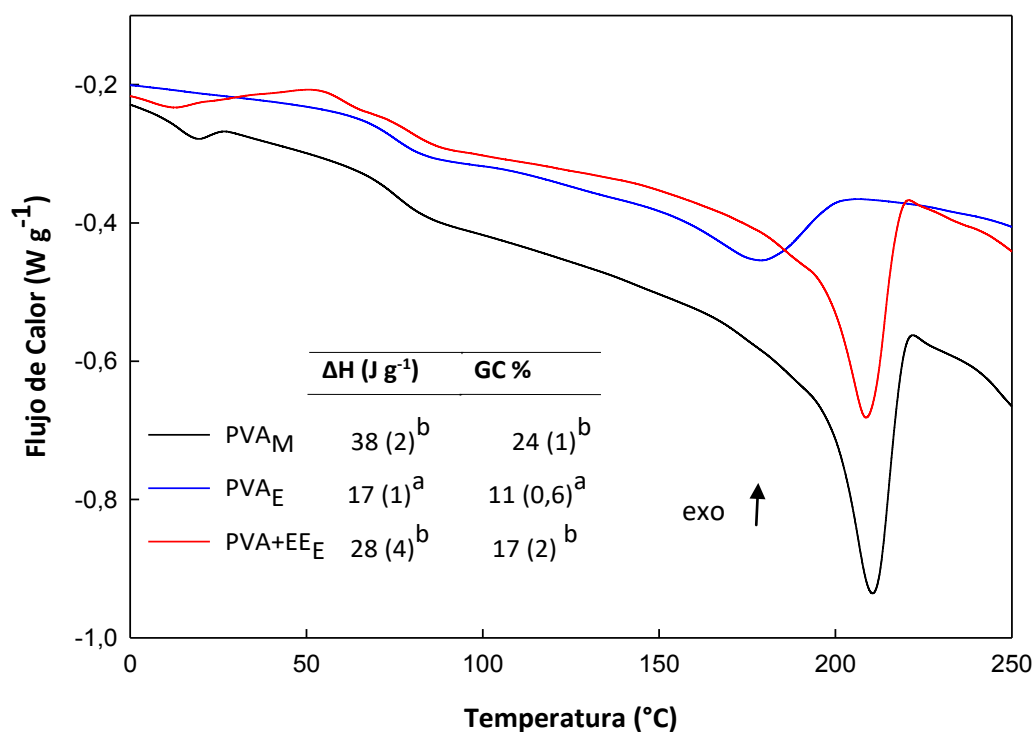


Figura 5.12. Termogramas correspondientes a la segunda etapa de calentamiento de las fibras obtenidas por electrohilado y las matrices de PVA_M por la técnica de moldeo y deshidratación.

5.3.6 ATR-FTIR

Mediante ATR-FTIR se analizaron los cambios experimentados por el PVA luego del proceso electrohilado en los modos vibracionales característicos del polímero. En la Figura 5.13 a se muestran los espectros de las muestras de PVA_E y PVA_M en la región espectral asignada al modo vibracional de los grupos -OH del polímero, comprendida entre 1160 y 940 cm⁻¹ asignada a las bandas de absorción relacionadas con la cristalinidad del polímero (Villaruel y col., 2015).

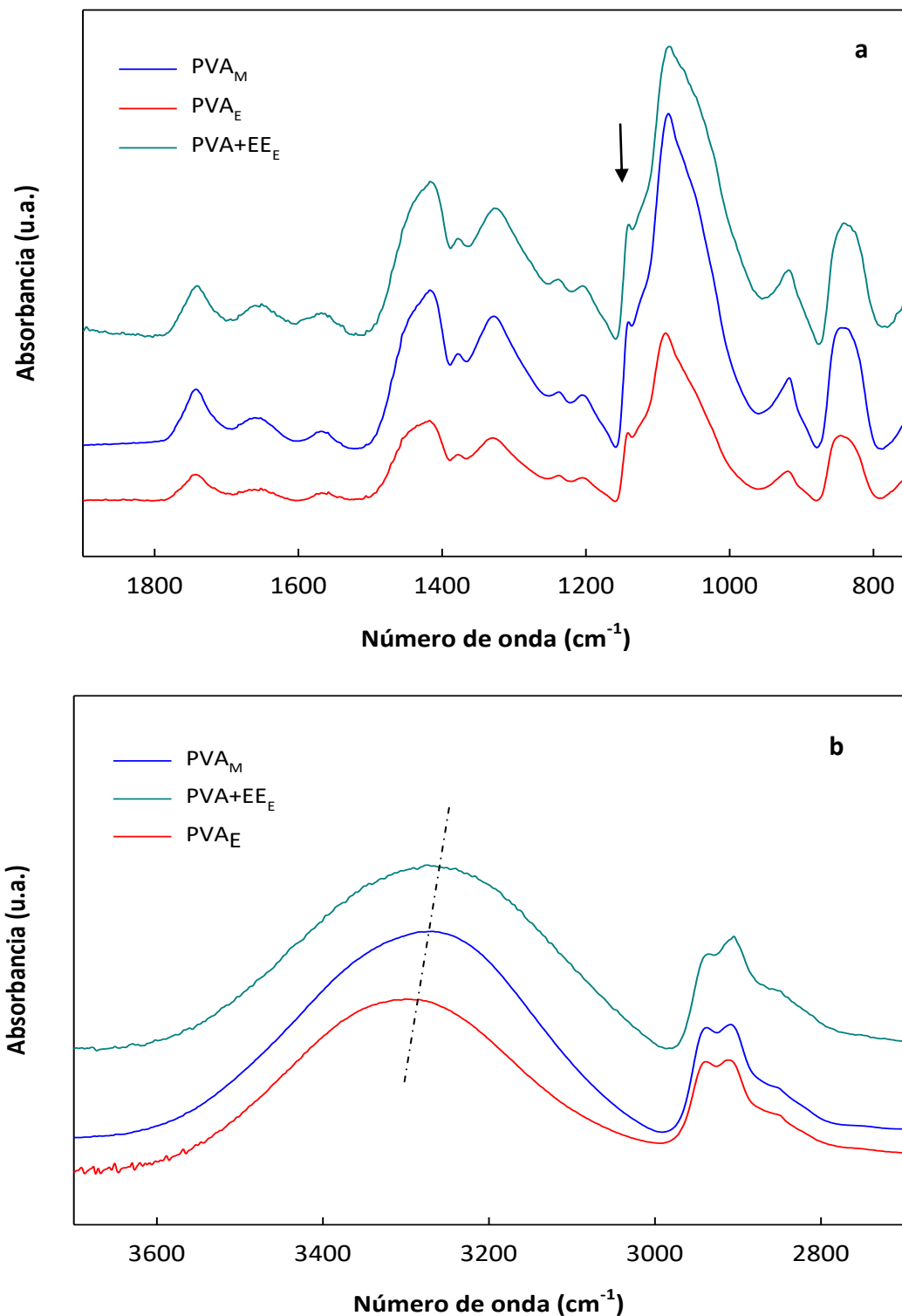


Figura 5.13. Espectros de absorción ATR-FTIR de las muestras ensayadas en las regiones comprendidas entre: **a)** 1800-800 cm⁻¹ y **b)** 3600-2800 cm⁻¹.

Del análisis de esta región se detectó la atenuación de la señal, indicando cambios relacionado con la cristalinidad del polímero (Naduparambath y col., 2018). Estos resultados se contrastaron con los resultados obtenidos por DRX y análisis térmico por DSC confirmando que la formación de fibras generó una perturbación del arreglo de las cadenas poliméricas.

Deng y col. (2018) encontraron que los cambios estructurales generados por el proceso de electrohilado pueden ser detectados a través de ATR-FTIR. La formación de fibras condujo a un corrimiento de la banda vibracional asociada al estiramiento del grupo OH. Estos cambios se codifican en modificaciones en los modos vibracionales de los grupos funcionales de los polímeros (Figura 5.13b). Diversos autores (Zoccola y col., 2008; Deng y col., 2018) explicaron que modificaciones en los modos vibracionales de los grupos funcionales de los polímeros están asociados a cambios en la estructura secundaria de los mismos, debido al proceso de formación de fibras por métodos electrodinámicos.

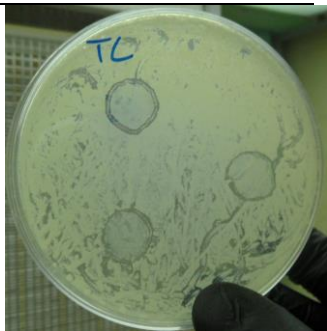

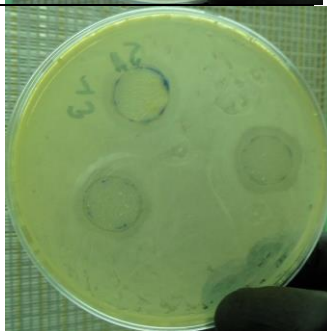

5.3.7. Capacidad antimicrobiana de las fibras

Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las nanoestructuras fibrosas PVA+EE_E frente a *Candida albicans*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los resultados se resumen en la Tabla 5.3.

Es importante destacar que todas las muestras se tornaron transparentes cuando tomaron contacto con el medio de cultivo. Según Cimadoro y col. (2018) las propiedades ópticas de las mallas nanoestructuradas cambian cuando se ponen en contacto con solventes o experimentan hinchamiento, debido a modificaciones del diámetro de las nanofibras y del índice de refracción relativo.

Se observó que las fibras formadas exhibieron capacidad antibacteriana frente a los distintos microorganismos ensayados, lo cual podría deberse a la presencia del aceite esencial en las muestras y a la difusión del compuesto una vez que tuvo contacto con el medio de cultivo. Las mallas obtenidas por deposición de fibras de PVA no presentaron actividad antibacteriana frente a los microorganismos estudiados. Este efecto fue explicado en el *Capítulo 4*. Similares resultados fueron informados por López-Córdoba y col. (2016) para ensayos realizados con *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 5.3. Capacidad antimicrobiana de las nanoestructuras fibrosas PVA+EE_E frente a inóculos de 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹ para distintos microorganismos

Patógeno	Halo de inhibición (cm)	Foto
<i>Candida albicans</i>	1,9 (0,7) ^{a,b}	
<i>E. coli</i>	1,6 (0,6) ^a	
<i>S. aureus</i>	2,1 (1) ^b	
<i>S. epidermidis</i>	1,8 (0,8) ^{a,b}	

*Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre muestras.

La actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* (bacterias Gram-positivas) de las nanoestructuras fibrosas funcionalizadas resultó ser mayor que la observada para *E. coli*. Esta diferenciación en la capacidad antibacteriana fue también comprobada por Adeli y col. (2019), quienes al trabajar con mallas fibrosas compuestas por quitosano, almidón y PVA nanoestructuradas por electrohilado, observaron que las mismas tenían una mayor capacidad antibacteriana frente a *S. aureus* en comparación a *E. coli*. Este fenómeno fue atribuido principalmente a las características superficiales de las células y a las diferencias estructurales de las paredes celulares de las bacterias.

5.4 Conclusiones

La técnica de electrohilado resultó ser un método eficiente para la obtención de nanoestructuras fibrosas a escala micro y nanométrica permitiendo ajustar la morfología de las fibras. A partir de los resultados obtenidos se dedujo que muchos de los parámetros que influyen en las características de las fibras están íntimamente relacionados y dependen en un amplio rango de las características intrínsecas del material base, así como de los parámetros del proceso.

Del análisis del comportamiento reológico de las soluciones a base de PVA surgió que la formulación de sistemas compuestos por ensamblado de una solución de PVA con una emulsión entrecruzada modificó la viscosidad influyendo en la morfología de las nanoestructuras obtenidas. En comparación con la metodología de moldeo, los procesos electrodinámicos generaron estructuras con propiedades diferenciales vinculados a la disposición de las cadenas poliméricas en la formación de la red.

Se diseñaron nuevas formas de incorporar compuestos activos en el sistema con el fin de aportar características distintivas, permitir la encapsulación y potenciar las propiedades de las fibras desarrolladas. Las nanoestructuras desarrolladas serían materiales con potencial aplicación en el campo biomédico.

Referencias

Adeli, H., Khorasani, M. T., y Parvazinia, M. (2019). Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 238-254.

Allahvaisi, S., Jahromi, K. T., Imani, S., y Khanjani, M. (2017). Contact toxicity of poly lactic acid nanofibers loaded with two essential oils against *Plodia interpunctella* Hub. (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Biopesticides*, 10(1), 50-59.

Angeles, M., Cheng, H. L., y Velankar, S. S. (2008). Emulsion electrospinning: composite fibers from drop breakup during electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(7), 728-733.

Basha, R. Y., Sampath Kumar, T. S., y Doble, M. (2017). Electrospun nanofibers of curdlan (β -1, 3 Glucan) blend as a potential skin scaffold material. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(4), 1600417.

Calzón Gutiérrez, A. (2016). Desarrollo de un equipo de electrospinning para obtención de nanofibras alineadas de recombinámeros tipo elastina.

Caracciolo, P. C., Buffa, F., Thomas, V., Vohra, Y. K., y Abraham, G. A. (2011). Biodegradable polyurethanes: comparative study of electrospun scaffolds and films. *Journal of Applied Polymer Science*, 121(6), 3292-3299.

Cimadoro, J., Ribba, L., Ledesma, S., y Goyanes, S. (2018). Electrospun Mats: From White to Transparent with a Drop. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303(10), 1800237.

Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J. D., Hirvonen, J. K., y Tan, N. B. (2001). Controlled deposition of electrospun poly (ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 42(19), 8163-8170.

Deng, L., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., y Zhang, H. (2018). Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocolloids*, 74, 324-332.

Drosou, C. G., Krokida, M. K., y Biliaderis, C. G. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, 35(2), 139-162.

Enayati, M. S., Behzad, T., Sajkiewicz, P., Bagheri, R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Łojkowski, W., Pahlevanneshan Z. y Ahmadi, M. (2016). Crystallinity study of electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibers: effect of electrospinning, filler incorporation, and heat treatment. *Iranian Polymer Journal*, 25(7), 647-659.

Ghosal, K., Chandra, A., Praveen, G., Snigdha, S., Roy, S., Agatemor, C., Thomas S., y Provaznik, I. (2018). Electrospinning over solvent casting: Tuning of mechanical properties of membranes. *Scientific Reports*, 8(1), 5058.

Ghosh, S. K., Adhikary, P., Jana, S., Biswas, A., Sencadas, V., Gupta, S. D., Tudu B., y Mandal, D. (2017). Electrospun gelatin nanofiber based self-powered bio-e-skin for health care monitoring. *Nano Energy*, 36, 166-175.

Guo, M., Bi, S., Liu, J., Xu, W., Zhou, G., Liu, Y., y Chen, C. (2017). C60 (OH) n-loaded nanofibrous membranes protect HaCaT cells from ROS-associated damage. *Chinese Chemical Letters*, 28(9), 1889-1892.

Karimi, M. A., Pourhakkak, P., Adabi, M., Firoozi, S., Adabi, M., y Naghibzadeh, M. (2015). Using an artificial neural network for the evaluation of the parameters controlling PVA/chitosan electrospun nanofibers diameter. *e-Polymers*, 15(2), 127-138.

Krstić, M., Radojević, M., Stojanović, D., Radojević, V., Uskoković, P., y Ibrić, S. (2017). Formulation and characterization of nanofibers and films with carvedilol prepared by electrospinning and solution casting method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 160-166.

Larrondo, L., y St. John Manley, R. (1981). Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 19(6), 909-920.

López-Córdoba, A., Castro, G. R., y Goyanes, S. (2016). A simple green route to obtain poly (vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 726-732.

Naduparambath, S., Sreejith, M.P., Jinitha, T.V., Shaniba, V., Aparna, K.B., y Purushothaman, E. (2018). Development of green composites of poly (vinyl alcohol) reinforced with microcrystalline cellulose derived from sago seed shells. *Polymer Composites*, 39(9), 3033-3039.

Olabisi, O., Robeson, L. M., y Shaw, M. T. *Polymer-Polymer Miscibility*, 1979.

Pal, J., Wu, D., Hakkarainen, M., y Srivastava, R. K. (2017). The viscoelastic interaction between dispersed and continuous phase of PCL/HA-PVA oil-in-water emulsion uncovers the theoretical and experimental basis for fiber formation during emulsion electrospinning. *European Polymer Journal*, 96, 44-54.

Pangon, A., Saesoo, S., Saengkrit, N., Ruktanonchai, U., y Intasanta, V. (2016). Multicarboxylic acids as environment-friendly solvents and in situ crosslinkers for chitosan/PVA nanofibers with tunable physicochemical properties and biocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 138, 156-165.

Phachamud, T., y Phiriyawirut, M. (2011). Physical properties of polyvinyl alcohol electrospun fiber mat. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. April – June 2011 RJPBCS Volume 2 Issue 2.

Puttamayutanon, P., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., y Chantawannakul, P. (2012). Nanofiber production using polyvinylalcohol (PVA) and Thai honey and its properties. In *Advanced Materials Research* (Vol. 506, pp. 541-544). Trans Tech Publications.

Qin, X. H., y Wang, S. Y. (2008). Electrospun nanofibers from crosslinked poly (vinyl alcohol) and its filtration efficiency. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(2), 951-956.

Ranjbar-Mohammadi, M., Kargozar, S., Bahrami, S. H., y Joghataei, M. T. (2017). Fabrication of curcumin-loaded gum tragacanth/poly (vinyl alcohol) nanofibers with optimized electrospinning parameters. *Journal of Industrial Textiles*, 46(5), 1170-1192.

Rieger, K. A., y Schiffman, J. D. (2014). Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 113, 561-568.

Sapru, S., Das, S., Mandal, M., Ghosh, A. K., y Kundu, S. C. (2018). Prospects of nonmulberry silk protein sericin-based nanofibrous matrices for wound healing—in vitro and in vivo investigations. *Acta Biomaterialia*.

Sonina, A.N., Uspenskii, S.A., Vikhoreva, G.A., Filatov, Y.N., y Gal'Braikh, L.S. (2011). Production of nanofibre materials from chitosan by electrospinning. *Fibre Chemistry*, 42(6), 350-358.

Soto, K. M., Hernández-Iturriaga, M., Loarca-Piña, G., Luna-Bárcenas, G., Gómez-Aldapa, C. A., y Mendoza, S. (2016). Stable nisin food-grade electrospun fibers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(10), 3787-3794.

Sukigara, S., Gandhi, M., Ayutsede, J., Micklus, M., y Ko, F. (2003). Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer*, 44(19), 5721-5727.

Talebian, S., Afifi, A.M., y Khanlou, H.M. (2014). Fabrication and characterisation of chitosan/poly vinyl alcohol nanofibres via electrospinning. *Materials Research Innovations*, 18(sup6), S6-331.

Tijing, L. D., Park, C. H., Choi, W. L., Ruelo, M. T. G., Amarjargal, A., Pant, H. R., Im I.T. y Kim, C. S. (2013). Characterization and mechanical performance comparison of multiwalled carbon nanotube/polyurethane composites fabricated by electrospinning and solution casting. *Composites Part B: Engineering*, 44(1), 613-619.

Van Etten, E. A., Ximenes, E. S., Tarasconi, L. T., Garcia, I. T., Forte, M. M., y Boudinov, H. (2014). Insulating characteristics of polyvinyl alcohol for integrated electronics. *Thin Solid Films*, 568, 111-116.

Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 545-554.

Wang, Z. M. (Ed.). (2008). *One-dimensional nanostructures* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.

Zhang, Y., Li, J. F., Qiu, K. H., Zhong, L. Z., Li, G. Y., Lai, X. F., y Zhang, P. C. (2014). Preparation of a novel chitosan-based composite nanofibers by electrospinning. In *Advanced Materials Research* (Vol. 850, pp. 136-139). Trans Tech Publications.

Zoccola, M., Aluigi, A., Vineis, C., Tonin, C., Ferrero, F., y Piacentino, M. G. (2008). Study on cast membranes and electrospun nanofibers made from keratin/fibroin blends. *Biomacromolecules*, 9(10), 2819-2825.

Anexo Biodegradación

A.1 Introducción

Los envases plásticos han resultado de gran importancia en la vida cotidiana, solucionando diversas necesidades, por lo que su utilización ha crecido en forma sostenida. Se estima que la producción de plástico alcanzó hasta el 2017 aproximadamente 8300 millones de toneladas métricas, de las cuales 6300 millones constituyen una fuente de residuos. Además, es importante destacar que el 79% de esos residuos habita en vertederos o en el entorno natural (Geyer y col., 2017). Esta gran cantidad de desechos fue impulsada por la vida moderna, donde el plástico se usa para muchos artículos desechables o de "uso único": desde botellas de bebidas hasta cubiertos y pañales.

En la FiguraA1 se muestra el tiempo requerido para que se degraden distintos plásticos utilizados en la vida cotidiana.

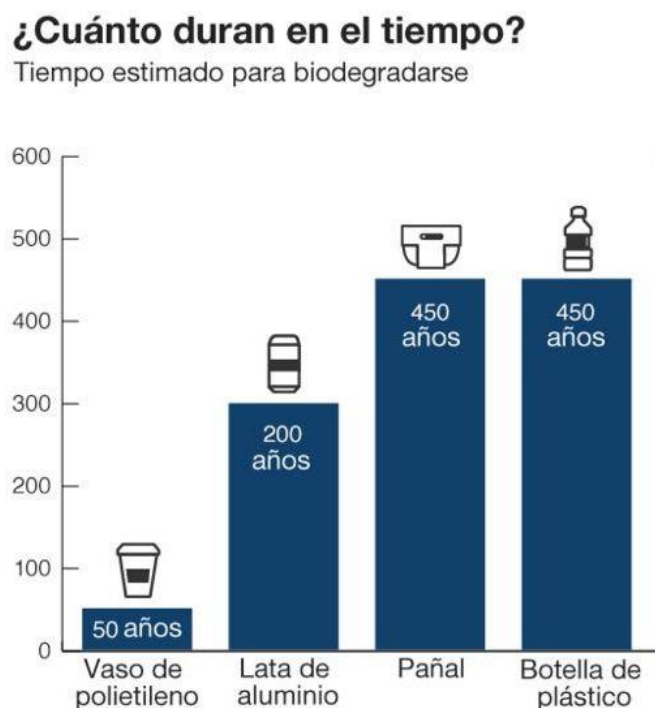


Figura A.1. Tiempo estimado de degradación de distintos materiales plásticos (NOAA/Woods sea grant 2017)

Una alternativa a esta problemática es la utilización de materiales que tengan como característica de ser biodegradables que pueden ser naturales o sintéticos.

El término degradación de polímeros se refiere a los procesos inducidos por la luz solar, calor, humedad, hongos bacterias y otros agentes que conducen a una modificación y al debilitamiento de la estructura del polímero (Mohee y col., 2008). Por otra parte la biodegradación se refiere a las transformaciones y deterioro del polímero ocasionado por la acción de organismos vivos. Este proceso está catalizado por la acción de hongos y bacterias, o por enzimas secretadas por los mismos. Este proceso da como resultado la producción de CO_2 , H_2O y biomasa.

Según Lucas y col. (2008) el mecanismo de biodegradación puede dividirse en distintos estadios, los cuales se describen a continuación:

- **Biodeterioro:** En este proceso la acción de comunidades microbianas en conjunto descomponen al polímero en fracciones.

- **Depolimerización:** Este paso está descrito por la secreción de agentes catalíticos (enzimas y radicales libres) capaces de “romper” las moléculas poliméricas reduciendo progresivamente su peso molecular, generando así oligómeros, dímeros y monómeros.

- **Biofragmentación:** Algunas de las moléculas generadas en el paso anterior pueden ser reconocidas por receptores de las membranas celulares de los microorganismos actuantes y así cruzar la membrana citoplasmática de las mismas. Las moléculas que no logran superar esa barrera permanecen en la matriz extracelular, lugar en donde pueden sufrir otras modificaciones químicas.

- **Asimilación:** En este proceso, las moléculas transportadas a través de la membrana citoplasmática se integran al metabolismo de los microorganismos para producir energía, nueva biomasa, vesículas de almacenamiento y diversos metabolitos primarios y secundarios.

- **Mineralización:** El último paso del proceso de biodegradación en el cual se liberan hacia el exterior moléculas pequeñas como CO_2 , H_2O y CH_4 .

Centrándose específicamente en los materiales utilizados el quitosano es un polímero que ha sido demostrado que posee una alta tasa de biodegradabilidad. En este caso una de las dependencias del proceso es el grado de desacetilación del polímero.

Como se ha mencionado en los capítulos anteriores de este trabajo los materiales nanocompuestos ofrecen diversas ventajas, en muchos casos suplantando a materiales que no son biodegradables; a pesar de esto hay que tener en cuenta que el rendimiento a largo plazo del nanocompuesto en sí mismo y el destino de los nanocompuestos y las nanopartículas después de su eliminación juegan un papel esencial en la aceptación y comercialización de estos materiales (Fan y col., 2017). Para la mayoría de los productos comerciales se espera que los materiales sufran una degradación durante su uso y su vida posterior.

Planteado esto, los objetivos del Anexo fueron:

Evaluar la biodegradación de los diferentes sistemas desarrollados, estudiando el efecto producido por la inclusión de la suspensión de nanopartículas.

A.2 Materiales

A.2.1 Evaluación de la biodegradación en suelo de las películas a base de quitosano

El estudio de la biodegradación de las películas poliméricas se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita en la Norma ASTM D5988-03, y realizando los experimentos bajo condiciones análogas a las ambientales.

Para desarrollar los ensayos se prepararon películas de 4 cm de diámetro. Las muestras se colocaron en un soporte constituido por una malla plástica, se enterraron en recipientes a una profundidad de 5, cm desde la superficie afin de asegurar la degradación aeróbica. Como medio degradante se utilizó la propia microflora presente en el suelo utilizado. Las características fisicoquímicas y la composición de la tierra usada se indican a continuación: humedad: 17-19%, cenizas: 76-79%, relación C/N: 11,5, materia orgánica: 3,5-4,5%, pH: 7 y

conductividad eléctrica: $0,5-1 \text{ mS cm}^{-1}$. De acuerdo a la metodología descrita en la Norma ASTM D5988-03 se adicionó 1 g de compost cada 25 g de tierra. Las características fisicoquímicas y la composición del compost utilizado fueron: humedad: 35-40%, cenizas: 40-45%, relación C/N: 7,7, materia orgánica: 15-20%, pH: 6,2 y conductividad eléctrica: $1,1 \text{ mS cm}^{-1}$.

Los recipientes se acondicionaron a una temperatura y una humedad relativa controlada de 20°C y 50% verificar, respectivamente, tomadas como condiciones ambientales medias. En todos los casos las películas se regaron frecuentemente con un rociador.

Se utilizaron las películas nanocompuestas sintetizadas en el *Capítulo 3*.

A.2.2 Estudios morfológicos

El análisis de la morfología de las películas degradadas se realizó por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200.

Se evaluaron distintos tiempos de exposición para hacer un seguimiento del grado de avance de la degradación de los materiales. Se realizaron inspecciones visuales de las películas luego de haberlas extraído de los recipientes a los distintos tiempos de ensayo y se tomaron fotografías de las mismas.

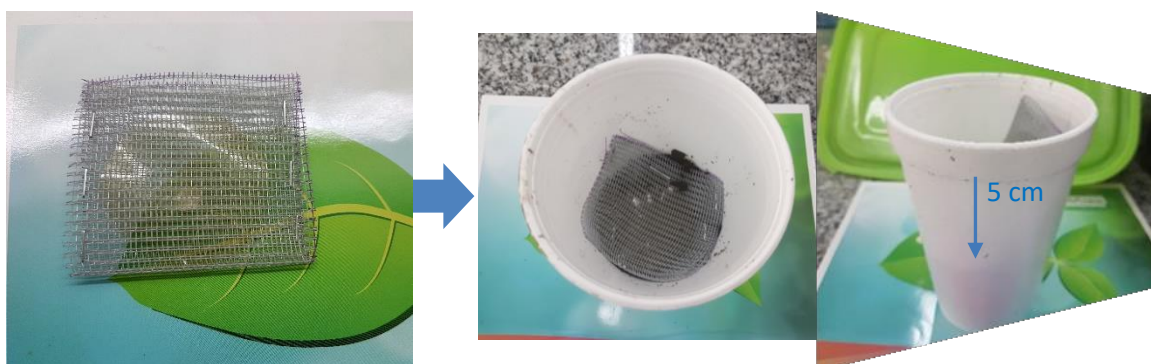
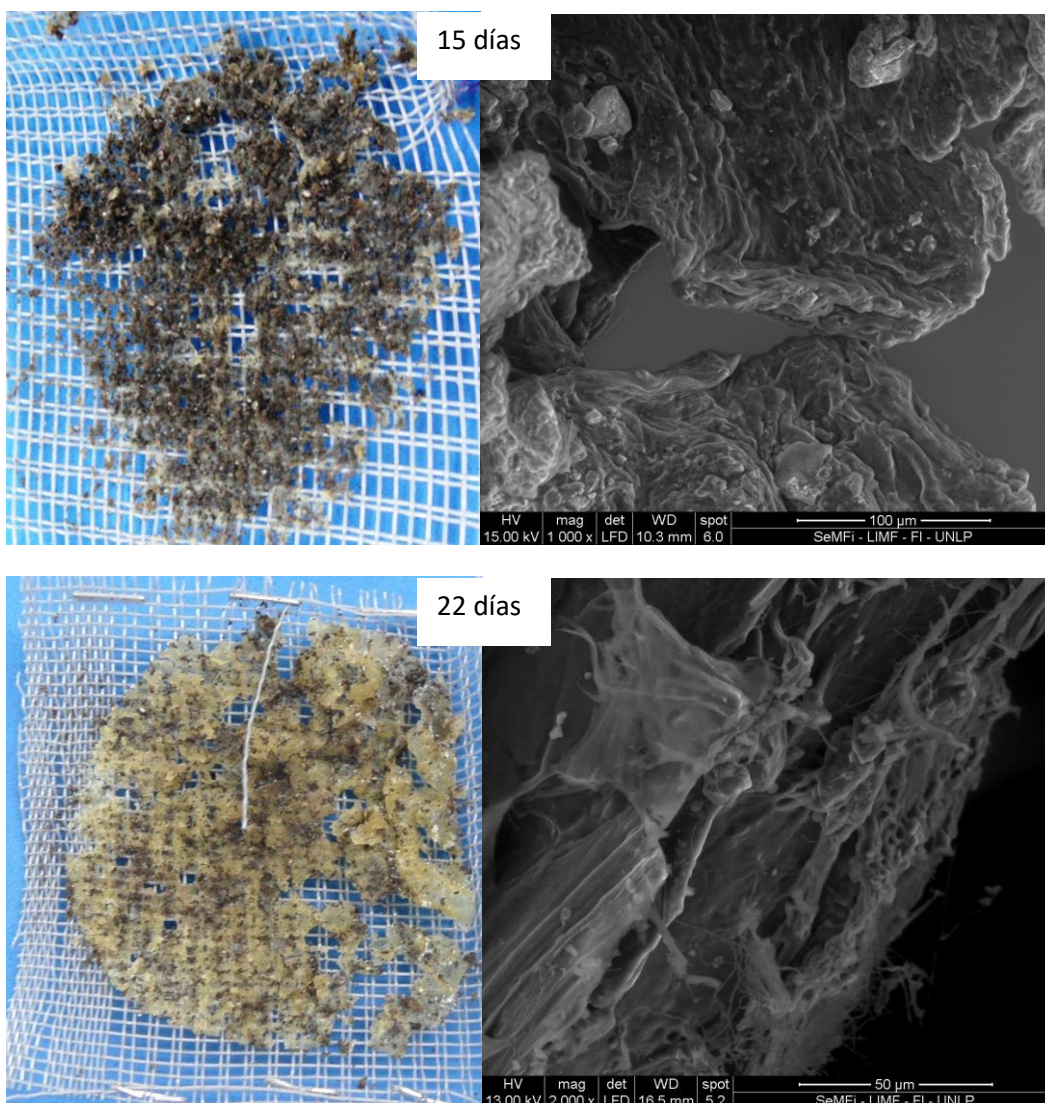


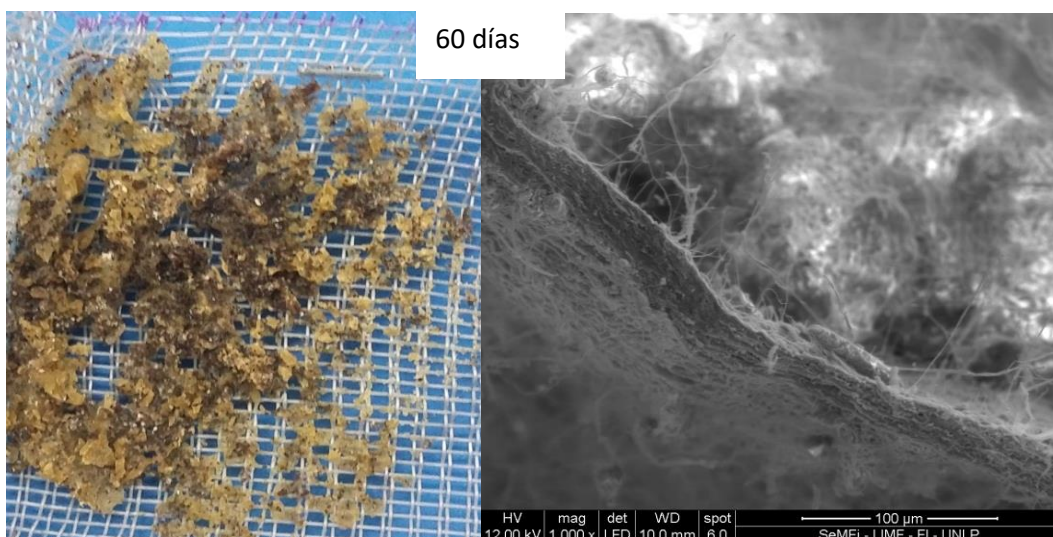
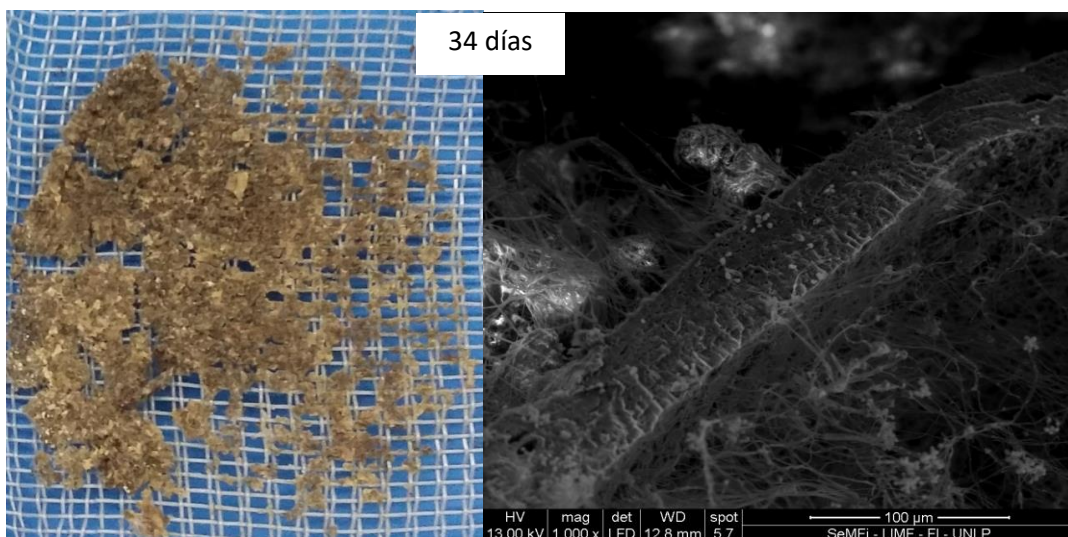
Figura A.2. Esquema representativo del ensayo de biodegradación.

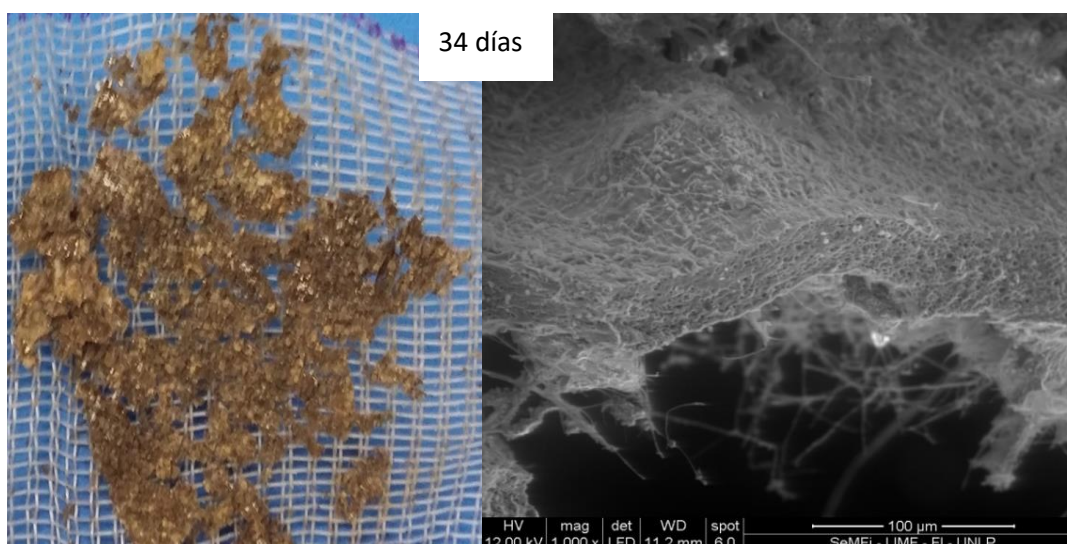
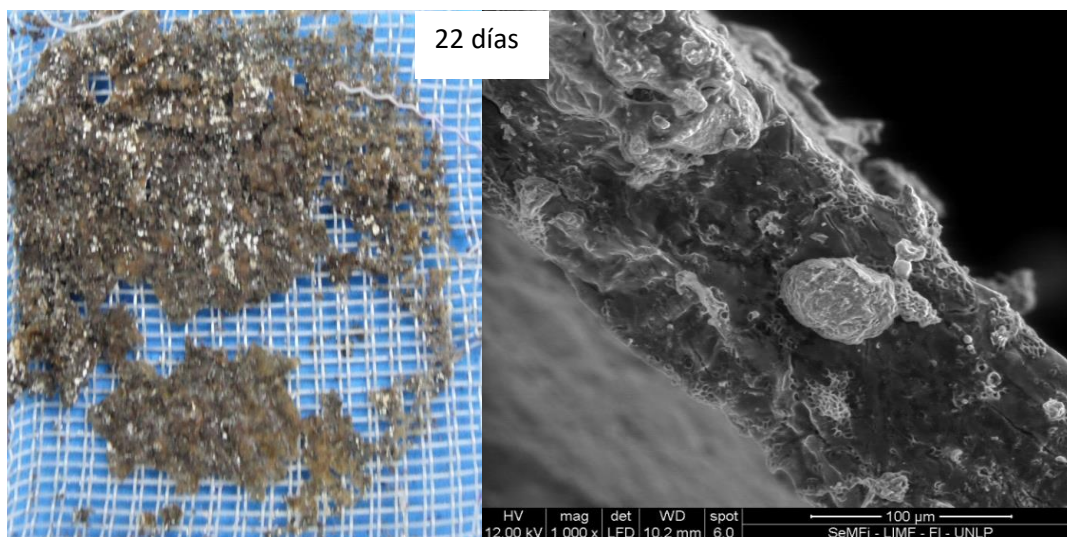
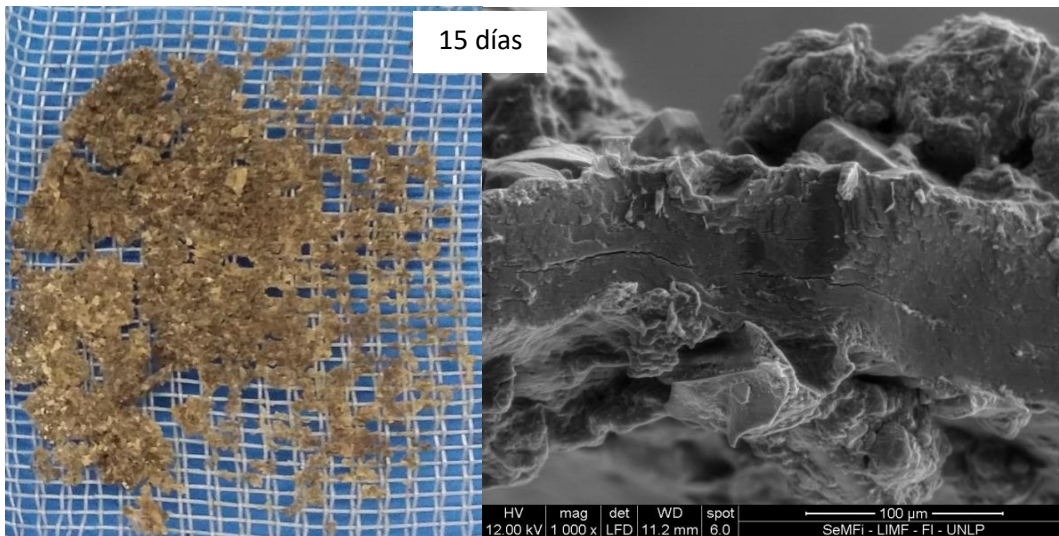
A.3 Resultados

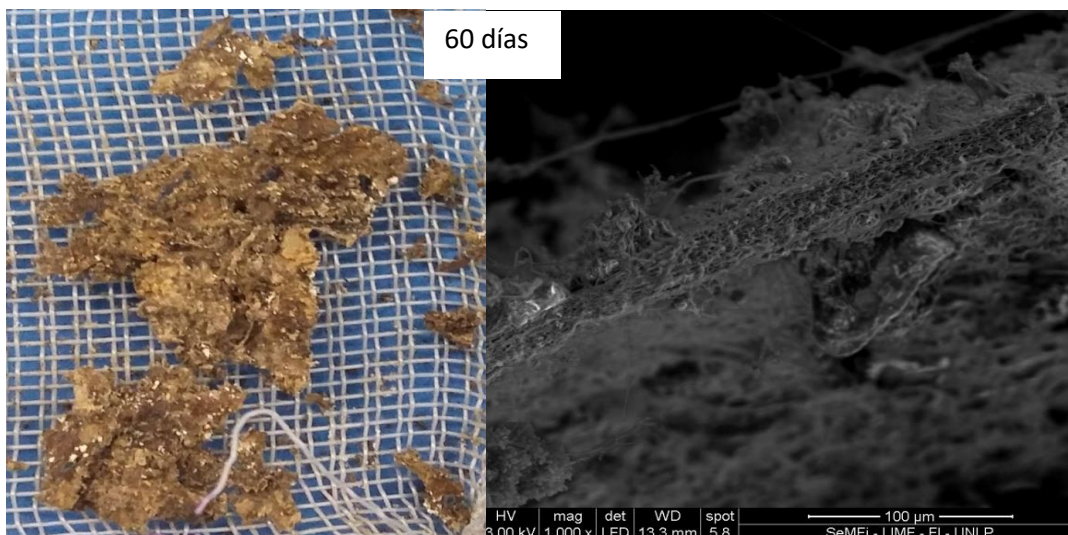
Las matrices nanocompuestas ensayadas presentaron una alta tasa de biodegradación. Al cabo del día 15 las muestras se observaron desintegradas a simple vista, por lo cual no pudo realizarse un seguimiento por pesada. En las fotografías se observa que al agregar nanopartículas las matrices de Q se vuelven más resistentes al proceso

Q 2%

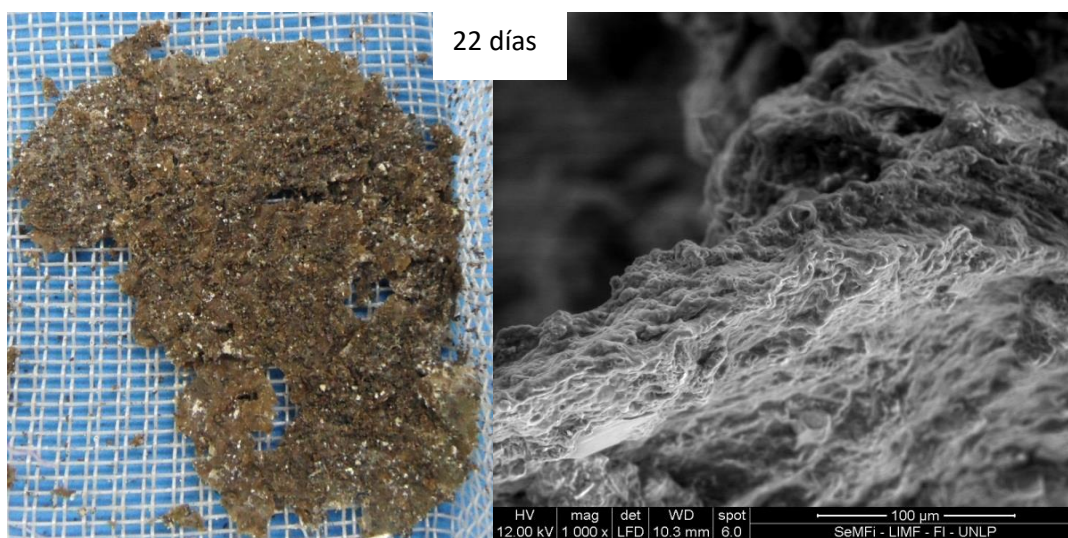
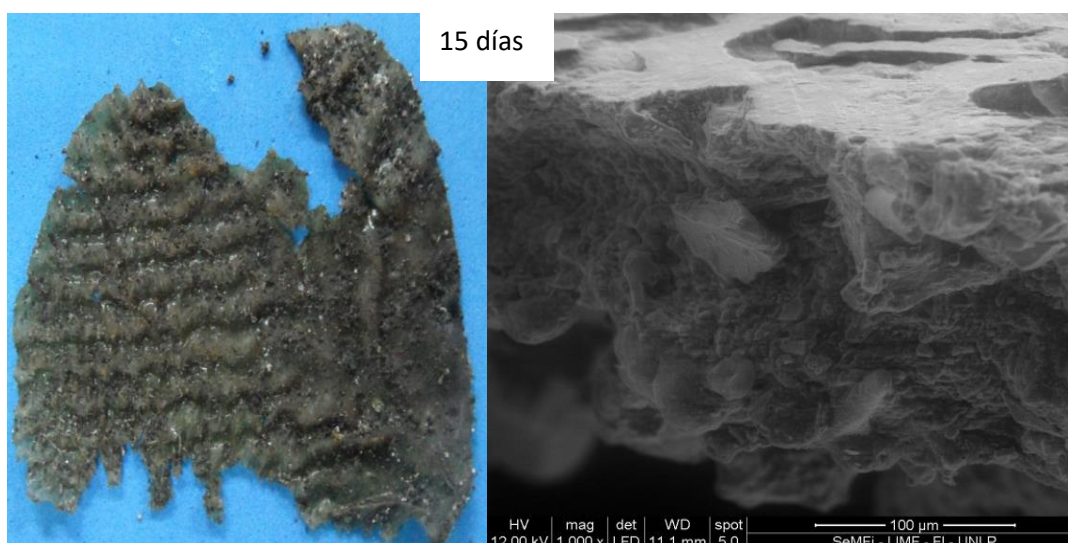


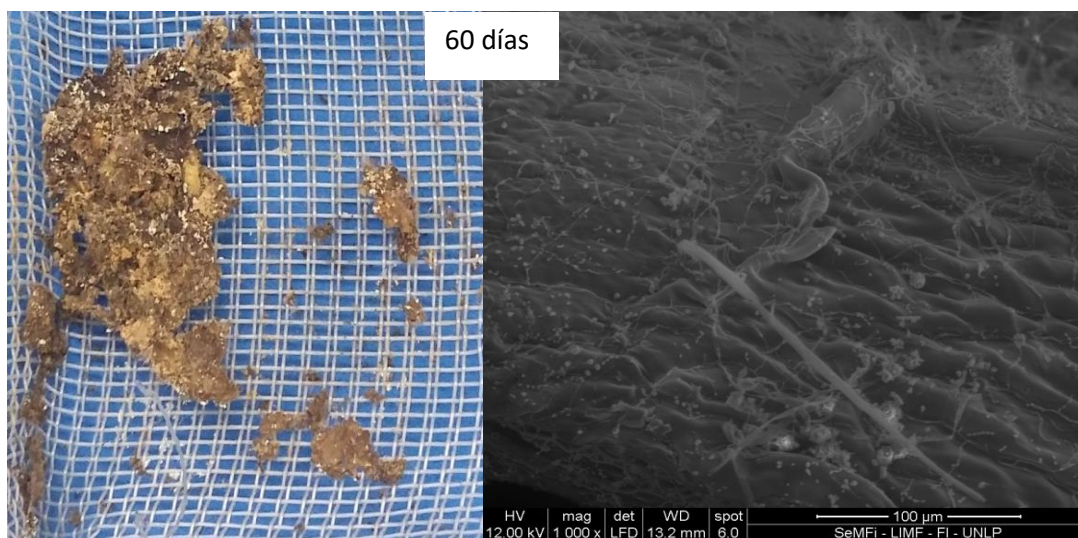




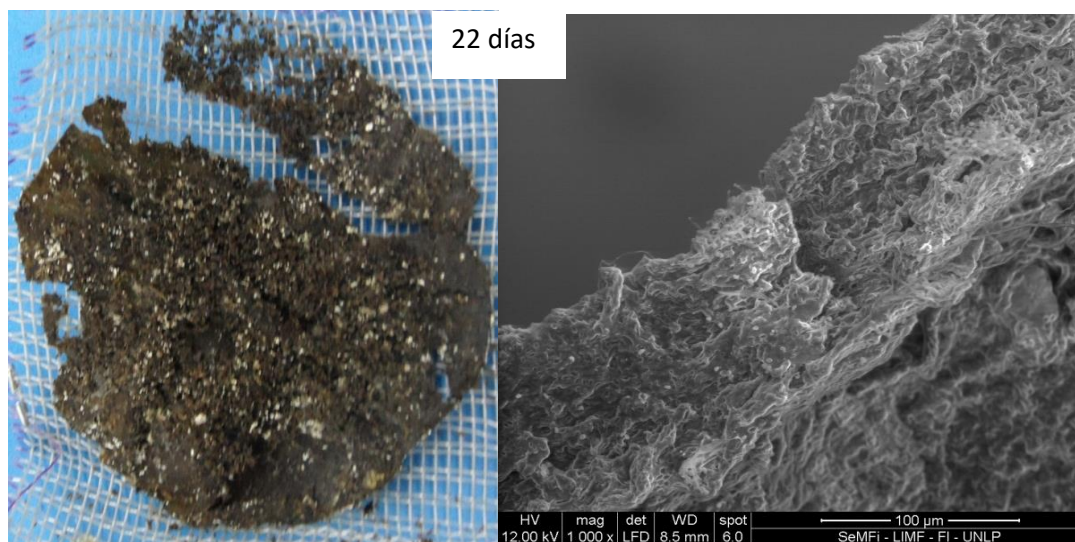
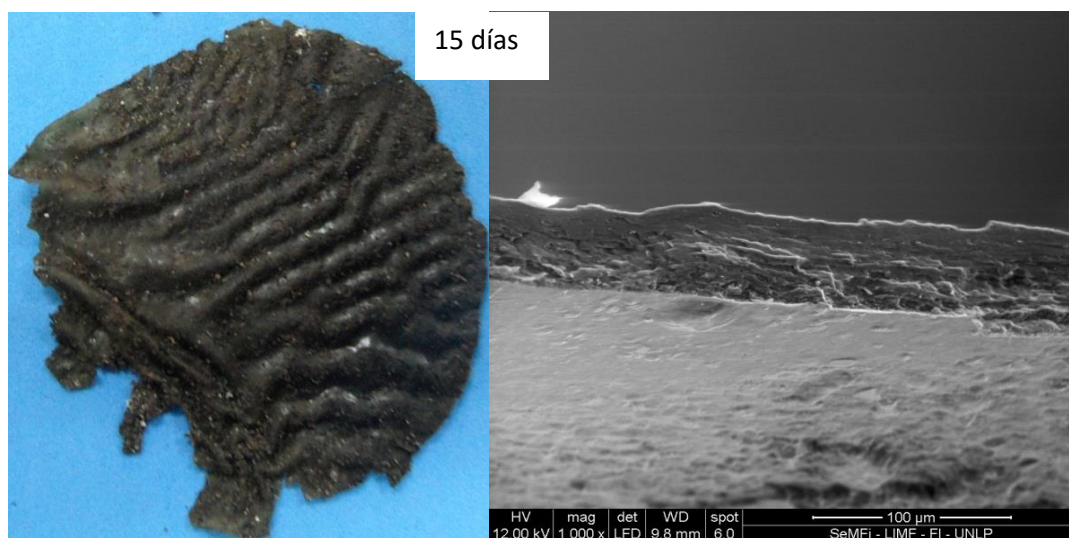


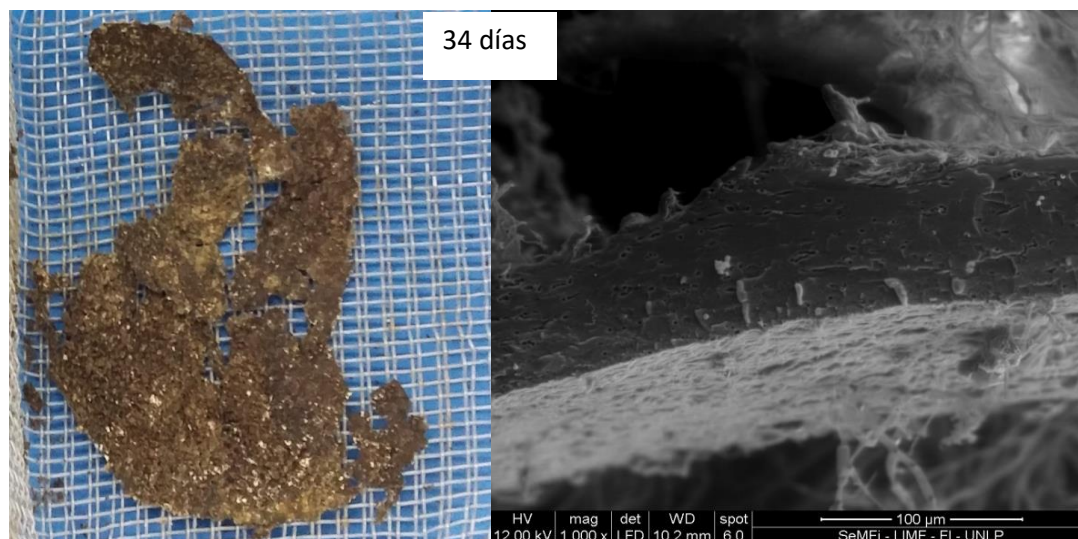
QN_B 1:0,5





QN_A 1:1





El quitosano es un polímero que presenta una alta tasa de biodegradación, debido a la presencia de sitios hidrofílicos en su estructura (Gaurav y col., 2012). Prashanth y col. (2005) afirman que en distintas bacterias y hongos se presentan enzimas quitosanasas, las cuales rompen las cadenas del polímero. Se puede observar que al cabo de 15 días se produjeron cambios desde el punto de vista macroscópico, los cuales se traducen en una modificación en la microestructura observada por SEM. A los 28 días se pudo observar un cambio de color en la película, probablemente relacionado con modificaciones de tipo químicos. Debido a que las películas se encontraban muy degradadas no fue posible realizarle medidas complementarias (FTIR y colorimetría) para confirmar esto.

Las micrografías obtenidas por SEM permitieron visualizar que los cambios microestructurales son más marcados con el transcurso del tiempo, pudiendo visualizarse la presencia de hongos filamentosos en la superficie de las películas de Q.

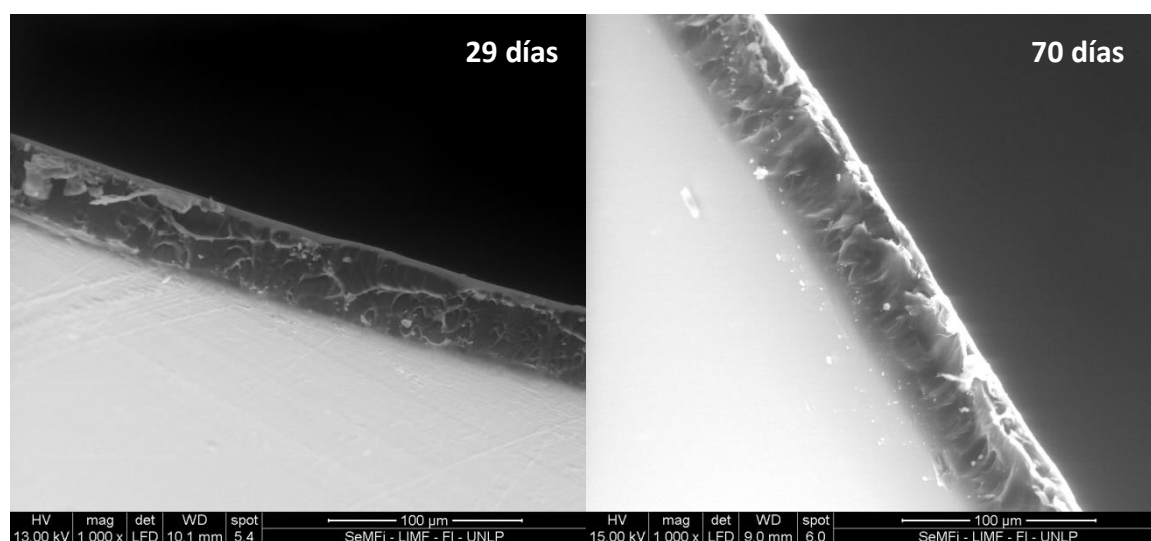
El agregado de nanopartículas generó modificaciones en la matriz. Mientras al cabo de 15 días las películas individuales ya se presentaban con un nivel de degradación alto, en las formulaciones QN_A y QN_B en proporción 1:0,5 el cambio de color se empezó a detectar a los 34 días. A ese tiempo también se observó la formación de hongos filamentosos en la

superficie de ambos nanocompuestos, que fue más prolífica en el caso de la matriz compuesta QN_B 2:1.

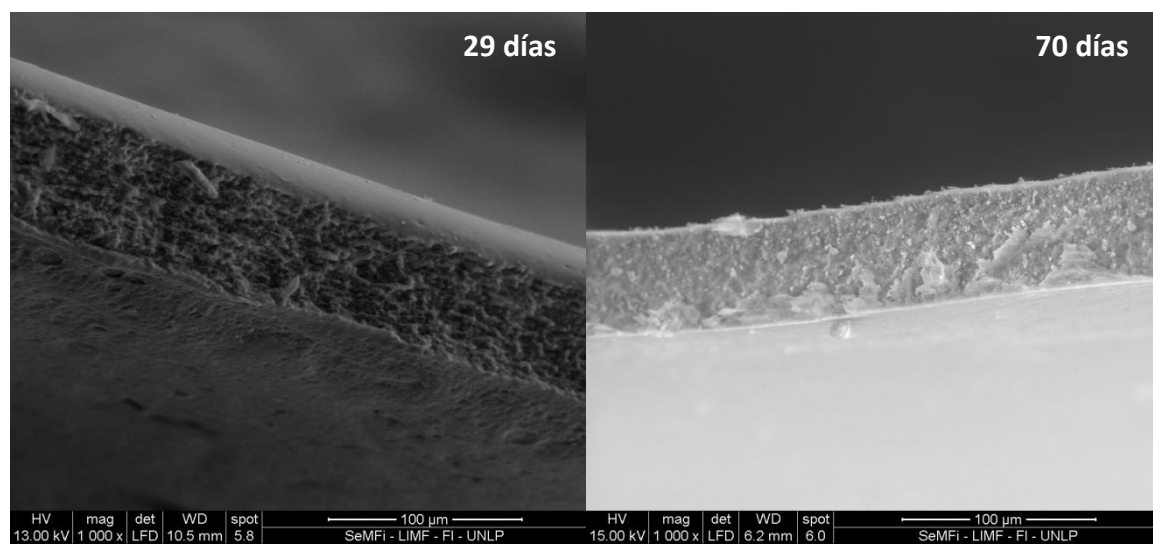
Analizando la película nanocompuesta con mayor proporción se observa que el proceso de biodegradación sufrió un retarda. A los 15 días se mantuvo la integridad estructural del nanocompuesto, observándose este hecho a simple vista y por SEM. El cambio en la coloración se visualizó después de 34 días. No obstante el hecho de que a ese tiempo había crecimiento de hongos demostrado a través de las micrografías, a los 60 días aún mostraba cierta integridad estructural relacionada con el aumento en el contenido de nanopartículas y por ende con el entrecruzamiento de la matriz.

Este resultado fue similar al observado por Fan y col. (2017) quienes evaluaron la biodegradabilidad de nanotubos de carbono en matrices de quitosano, correlacionándola con la capacidad de formar *biofilms* de distintas bacterias y hongos en la superficie de los materiales. Estos autores informaron que el agregado de mayores cantidades de nanotubos generó una disminución en la capacidad para formar *biofilms*, indicando que la presencia de nanotubos tuvo una capacidad inhibitoria sobre los microorganismos evaluados.

PVA



EE_A-PVA 1:1



Como puede verse en las Figuras las matrices de PVA no llegaron a biodegradarse a los 70 días, producto de su cristalinidad que le confiere una mayor resistencia al ataque microbiano (Tudorachi y col., 2000). Por otra parte, el PVA posee una limitada cantidad de microorganismos que son capaces de actuar sobre este material (Tang y Alavi, 2011), siendo menos susceptible a biodegradarse.

La incorporación de la emulsión, si bien generó una matriz que mantiene su integridad estructural, presentó algunas modificaciones traducidas en un cambio en la microestructura de la muestra. Este fenómeno puede explicarse considerando que la presencia de la emulsión disminuye el grado de cristalinidad del PVA y en consecuencia aumenta su biodegradabilidad. Este resultado fue análogo al encontrado por Valencia y col. (2013) y por Tudorachi y col. (2000). En ambos trabajos sintetizaron matrices compuestas por almidón y PVA. Variando las proporciones de este último, observaron que el aumento del contenido de PVA condujo a un incremento del grado de cristalinidad y a un retardo en el proceso de biodegradación.

Referencias

Fan, J., Grande, C. D., y Rodrigues, D. F. (2017). Biodegradation of graphene oxide-polymer nanocomposite films in wastewater. *Environmental Science: Nano*, 4(9), 1808-1816.

Gaurav, A., Ashamol, A., Deepthi, M. V., y Sailaja, R. R. N. (2012). Biodegradable nanocomposites of cellulose acetate phthalate and chitosan reinforced with functionalized nanoclay: mechanical, thermal, and biodegradability studies. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(S1), E16-E26.

Geyer, R., Jambeck, J. R., y Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782.

Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques—A review. *Chemosphere*, 73(4), 429-442.

Mohee R., Unmar G.D., Mudhoo A., y Khadoo P. (2008). Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management*, 28, 1624-1629.

Prashanth, K. H., Lakshman, K., Shamala, T. R., y Tharanathan, R. N. (2005). Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(2), 115-120.

Tang, X., y Alavi, S. (2011). Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 7-16.

Tudorachi, N., Cascaval, C. N., Rusu, M., y Pruteanu, M. (2000). Testing of polyvinyl alcohol and starch mixtures as biodegradable polymeric materials. *Polymer Testing*, 19(7), 785-799.

Valencia, A., Rivera, C., y Murillo, E., A. (2013). Estudio de las propiedades de mezclas de alcohol polivinilico-almidon de yuca-sorbitol obtenidas por casting. Revista Colombiana de Materiales, 4, 41-55.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se llevó a cabo la caracterización del material base, quitosano, subproducto de la industria pesquera, por tratarse de un producto natural proveniente de distintas fuentes de la biomasa, con gran variabilidad en sus propiedades lo que condiciona las aplicaciones de sus derivados.
- Se diseñaron nanopartículas con ácido gálico (AG) encapsulado, compuesto con reconocidas propiedades antimicrobianas y antioxidantes, con capacidad para interactuar con el quitosano desempeñándose como agente reticulante y estabilizante de las suspensiones.
- Se ajustó la formulación de las nanopartículas funcionalizadas con ácido gálico a través de la optimización mediante el uso de un diseño experimental (superficie de respuesta) considerando como respuestas evaluadas, el potencial zeta, grado de encapsulación y tamaño de nanopartículas. Asimismo, los análisis de estabilidad realizados complementaron el proceso de optimización, que fueron las bases para la selección de dos formulaciones para su posterior estudio y aplicación en un material soporte.
- La incorporación de las nanopartículas funcionalizadas a una matriz de quitosano permitió obtener nanocompuestos con propiedades diferenciadas desde la perspectiva de la liberación controlada del compuesto activo. Las propiedades estuvieron moduladas principalmente por reacciones de entrecruzamiento entre el quitosano, el TPP y el AG que permitieron disminuir su solubilidad e incrementar su hinchamiento sin perder su integridad estructural, convirtiéndolos en materiales aptos como dispositivos de liberación controlada. El mecanismo de liberación del ácido gálico fue estudiado, comprobándose un comportamiento no-fickiano debido al hinchamiento de las matrices, siendo este tipo de materiales particularmente valorado en el área de alimentos.
- Los nanocompuestos funcionalizados se combinaron con PVA, polímero sintético biodegradable, obteniendo sistemas bicapa por medio del procesamiento por termocompresión que permitiría una producción escalable. Las bicapas resultaron

altamente eficientes para el envasado de alimentos susceptibles de sufrir oxidación lipídica por su capacidad barrera al UV y al oxígeno.

- Se desarrolló un apósito biodegradable destinado a lesiones cutáneas y a la cicatrización de heridas superficiales leves de la piel, encapsulando aceite esencial de cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*), popularmente usado para tratamientos de úlceras. La emulsión O/W funcionalizada con el AE y entrecruzada con citrato de sodio en presencia de quitosano fue ensamblada con una matriz soporte de PVA. Así, se obtuvo un apósito con excelentes propiedades, flexible, adaptable, que asegura una buena adhesión superficial. Las distintas barreras ofrecidas por el apósito a la difusión del aceite esencial permitieron la dosificación sostenida del mismo.
- Los apósitos desarrollados permitieron la penetración del compuesto activo por la vía tópica, que presentó características fisicoquímicas que facilitaron su penetración por la barrera impermeable del estrato córneo llegando incluso a la epidermis viable.
- La puesta a punto de la técnica de electrohilado para la obtención matrices nanoestructuradas a base de PVA con la inclusión de una emulsión funcionalizada con AE de cabreuva permitió obtener un material con propiedades antimicrobianas demostradas frente a microorganismos patógenos presentes habitualmente en infecciones cutáneas. Por lo tanto, las nanoestructuras obtenidas por electrohilado tienen potenciales aplicaciones en el campo biomédico y cosmético. Las propiedades inherentes a la morfología de los sistemas nanofibrosos desarrollados facilitan la adhesión y la vehiculización del compuesto activo.
- Con la presencia de quitosano como el hilo conductor del trabajo de Tesis, se lograron desarrollar nanopartículas y nanoemulsiones funcionalizadas a base de este biopolímero con potencial uso en procesos de liberación controlada del principio activo en diferentes sustratos tanto alimenticios como biomédicos.

En conclusión, se diseñaron materiales como sistemas portadores de compuestos activos con distintas prestaciones aplicables en el campo de los alimentos y áreas biomédicas. A través de modificaciones en las variables del proceso y las barreras físicas implementadas, las matrices desarrolladas se comportaron como dispositivos de liberación controlada.